

*Xantofill-ciklus függő folyamatok módosulása gyomnövények herbicid-  
rezisztens mutánsaiban*

PhD Értekezés

Készítette: Váradi Gyula

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Növénytani Tanszék, Szeged  
FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Kecskemét

Témavezető: Prof. Dr. Lehoczki Endre

2004.





## Bevezetés

### 1. Szakirodalmi áttekintés

#### 1.1. A fény káros hatásai fotoszintetizáló növényekben

##### 1.1.1. Oxidáló molekulák keletkezése a fotoszintézisben

##### 1.1.2. A fotooxidatív károsítás célpontjai

#### 1.2. A fény káros hatásaival szemben kialakult védőmechanizmusok növényekben

##### 1.2.1. A fénygyűjtő antenna méretének szabályozása

##### 1.2.2. A fotoprotekció fotokémiai útjai

###### 1.2.2.1. Asszimilációs célú lineáris elektrontranszport

###### 1.2.2.2. Oxigénfüggő elektrontranszport

###### 1.2.2.3. Ciklikus elektrontranszport

##### 1.2.3. Károsító oxigénformák hatástalanítása

###### 1.2.3.1. Antioxidáns molekulák

###### 1.2.3.2. Enzimatisz befogás

##### 1.2.4. A elnyelt fényenergia fölslegének hődisszipációja, a nem-fotokémiai kioltás

###### 1.2.4.1. A xantofill-ciklus működése magasabb rendű növényekben

###### 1.2.4.2. A xantofill-ciklus függő nem-fotokémiai kioltás mechanizmusa

##### 1.2.5. A PSII helyreállítása mint fotoprotektív mechanizmus

#### 1.3. Az atrazin-rezisztencia mechanizmusa és kísérő jelenségei

#### 1.4. Az *Erigeron canadensis* paraquat-rezisztenciája és feltételezett mechanizmusa

#### 1.5. Előzmények

#### 1.6. Célkitűzés

### 2. Anyag és módszer

#### 2.1. A vizsgált növényfajok

#### 2.2. A kísérleti növények nevelése

#### 2.3. A levelek fotoszintetikus pigment összetételének mérése

#### 2.4. A levelek fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációjának mérése

#### 2.5. Klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása

#### 2.6. Szuperoxid-gyökök kimutatása ESR eljárással

### 3. Eredmények és megvitatás

#### 3.1. Vizsgálatok az AR gyom biotípusokkal

##### 3.1.1. Fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció és növekedés

##### 3.1.2. Az elnyelt fényenergia hasznosulása

3.1.3. A xantofill-ciklus működése a D1 mutáns gyomnövényekben

3.1.4. Az aszkorbát szerepe a kloroplasztisz működésében

3.2. Paraquat hatásának vizsgálata betyárkórón

3.2.1. Fotoszintetikus folyamatok kezdeti gátlása a rezisztens biotípusban

3.2.2. A xantofill-ciklus és a nem-fotokémiai kioltás alakulása Pq jelenlétében

3.2.3. Szuperoxid szabadgyökök keletkezése

4. Összefoglalás

5. Következtetések

6. Summary

7. Conclusions

Köszönetnyilvánítás

Szakirodalmi hivatkozások

Függelék



### A dolgozatban alkalmazott rövidítések:

A	nettó CO <sub>2</sub> -asszimilációs ráta ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
ANT	anteraxantin
APX	aszorbát-peroxidáz
AR	atrazin-rezisztens
CAT	kataláz
Chl	klorofill
DEI	de-epoxidációs index
DTT	ditiotreitol
E <sub>i</sub>	epoxidációs index
F <sub>0</sub>	alapfluoreszcencia
ETR	fotoszintetikus elektrontranszport ráta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
F <sub>m</sub>	maximális fluoreszcencia sötétadaptációt követően
F <sub>m</sub> '	maximális fluoreszcencia aktinikus megvilágítás mellett
F <sub>s</sub>	állandósult (steady-state) fluoreszcencia
F <sub>0</sub> '	megvilágítást követően mérhető alapfluoreszcencia
$\Delta F$	$F_m - F_m'$
GR	glutation-reduktáz
LHCII	a PSII fénygyűjtő pigment-protein komplexe
NPQ	nem-fotokémiai kioltás mérőszáma
P680	PSII reakciócentrum
PAR	fotoszintetikusan aktív fény (400-700 nm)
Pq	paraquat (metilviologén)
PQ	plasztokinon
PqAR	paraquat-atrazin ko-rezisztens
PqR	paraquat-rezisztens
PSI	első fotokémiai rendszer
PSII	második fotokémiai rendszer
Q <sub>A</sub>	elsődleges kinon akceptor
qE	energiafüggő nem-fotokémiai kioltás koefficiense
qP	fotokémiai kioltási koefficiens
SOD	szuperoxid-diszmutáz
VDE	violaxantin de-epoxidáz
VIO	violaxantin
ZE	zeaxantin epoxidáz
ZEA	zeaxantin

## Rövid kivonat

A D1 protein Ser<sub>264</sub>→Gly mutációja okozta pleiotrop hatásokat tanulmányoztuk az *Amaranthus retroflexus* L. (szőrös disznóparéj), *Chenopodium album* L. (fehér libatop), *Epilobium adenocaulon* Hausskn. (jövevény fűzike), *Erigeron canadensis* L. (betyárkóró), *Senecio vulgaris* L. (közönséges aggófű) és *Solanum nigrum* L. (fekete csucor) kétszikű gyomok vad és D1 mutáns (atrazin-rezisztens) biotípusain. Megállapítottuk, hogy (1) a D1 mutánsban a fény indukálta zeaxantin képződés mintegy 30%-ban gátolt, amelynek hátterében a lelassult fotoszintetikus elektrontranszport, s a tilakoid lumenben egyes kulcsfontosságú protonálódási folyamatok gátoltsága állhat. Kimutattuk (2) a D1 mutánsban az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosulásának és a nem-fotokémiai energia disszipációs védőmechanizmusnak a kedvezőtlen arányeltolódását, amelynek része lehet e biotípus nagyobb fényérzékenységében, kisebb bioprodukciónak és gyengébb kompetíciós képességében. Ezt súlyosbíthatja még (3) a D1 mutánsban magasabb hőmérsékleten megfigyelt nettó fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció csökkenés.

A paraquat rezisztenciával és paraquat hatással kapcsolatos kísérletekhez az *Erigeron canadensis* L. (betyárkóró) vad, paraquat-rezisztens és paraquat-atrazin ko-rezisztens biotípusait használtuk. Megállapítottuk, hogy (1) a paraquat a szenzitív növényben 30 percen belül tönkreteszi a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációt és O<sub>2</sub>-fejlődést, s az energia disszipációs védőmechanizmus működését. A paraquat-rezisztens növényekben ezek a folyamatok reverzibilisen gátlódnak. Kimutattuk, (2) hogy a paraquat-rezisztens biotípusokban paraquat hatására ESR technikával detektálható, megnövekedett és hosszantartó szuperoxid gyök termelődés zajlik, amely – a zeaxantin képződésben, a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációban és O<sub>2</sub>-fejlődésben, s a nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltásban általunk megfigyelt kezdeti hatásokkal együtt – minden eddigénél közvetlenebb bizonyítékát adja a paraquat rezisztens növény kloroplasztiszába történő bejutásának. Megfigyeltük, (3) hogy paraquat kezelést követően a rezisztens növény növekedése – különösen intenzív megvilágítás mellett – elmarad a kezeletlen kontrollétól, amely mögött feltehetően az elhúzódó oxidatív stressz okozta, tartósan kedvezőtlen energetikai helyzet áll.



## **Abstract**

Pleiotropic effects of the Ser<sub>264</sub>→Gly mutation on D1 protein were studied in the wild and D1 mutant biotypes of *Amaranthus retroflexus* L. (pigweed), *Chenopodium album* L. (goosefoot), *Epilobium adenocaulon* Hausskn. (willowherb), *Erigeron canadensis* L. (horseweed), *Senecio vulgaris* L. (common groundsel) and *Solanum nigrum* L. (black nightshade) dicot weeds. It was shown that (1) a 30% inhibited light-induced zeaxanthin formation existed in the D1 mutant, possibly due to the lowered photosynthetic electron transport and partially inhibited key protonation processes in the thylakoid lumen. It was revealed that (2) the ratio of the photochemical light utilization and the non-photochemical energy dissipation defence mechanism adversely shifted and this may have a role to play in the high photosensitivity, low bioproductivity and less competitiveness of the D1 mutant. This might be worsened by (3) the observed decline of net photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation in the D1 mutant at higher temperatures.

Wild, paraquat resistant and paraquat-atrazine co-resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. (horseweed) were used for the experiments related to paraquat effects and resistance to paraquat. It was shown that (1) paraquat destroys the photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation and O<sub>2</sub>-evolution and the non-photochemical energy dissipation defence mechanism within 30 min. These processes were only transiently inhibited in the paraquat resistant biotypes. It was revealed that (2) there is a paraquat induced and longer lasting increase in the generation of superoxide radicals in the paraquat-treated resistant plant. This provides – together with our observations on the transient effects of paraquat on photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation and O<sub>2</sub>-evolution and non-photochemical fluorescence quenching – the so far most direct evidence for the entrance of paraquat into the chloroplasts of resistant plants. It was observed that (3) paraquat-treated paraquat resistant plants – especially under high light conditions – fell behind in growth relative to the untreated control, possibly due to the permanently adverse energetic situation caused by the long lasting oxidative stress.

## Bevezetés

A növények életében a napfényt elsősorban, mint a fotoszintézis hajtóerejét és fontos élettani folyamatok szabályozóját tartjuk számon, pedig káros hatásai is lehetnek. A zöld növények életük igen jelentős részét kénytelenek olyan kedvezőtlen energetikai körülmények között leélni, amikor az elnyelt napsugárzás túlnyomó része nem hasznosulhat a fotoszintézisben. A növények ugyan hosszabb távon képesek alkalmazkodni a tartósan megváltozó fényviszonyokhoz, ami a maximális fényintenzitáshoz, vagy tartósan fennálló káros stressz helyzethez való akklimatizálódást jelenti, azonban még a legnagyobb fotoszintetikus teljesítményű gazdasági növények sem képesek minden határon túl növelni fényhasznosító kapacitásukat. A termikus disszipáció és az alternatív elektrontranszport utak, az antennaméret és a fotoszintetikus teljesítmény változásai segítenek egyensúlyt teremteni a fényabszorpció és hasznosulás között egy állandóan változó természeti környezetben. Többszörös, együttműködő és részben átfedő mechanizmusok segítenek kivédeni azt a nettó fotooxidatív károsodást, amelyet a fotoszintézis során termelődő reaktív molekulák okoznának. A redundancia nem meglepő, ha tekintetbe vesszük, hogy milyen kritikus a megfelelő fotoprotekció a növények fitnesze és túlélése szempontjából. Valóban, a fotoprotekcióban résztvevő számos molekula és enzim egynél több védőmechanizmusban is szerepet játszik. Például, a xantofillek egyaránt részei a hődisszipációnak és a  $^1\text{O}_2$  kioltási folyamatának, míg a szuperoxid diszmutáz és az aszcorbát peroxidáz enzimek befogják a reaktív oxigénformákat, miközben a víz-víz cikluson keresztül fenntartják az elektrontranszportot. Fentiek alapján érthető az a világszerte folyó nagy intenzitású kutatás, amely a védőmechanizmusok jobb megértését célozza. Ez volt témaválasztásom első számú motivációja.

Az emberiség történelmében igen korai időben elkezdődött a véletlenszerű, majd tudatos növénynemesítés, amelynek kezdettől a nagyobb élvezeti érték, a nagyobb produktivitás és a nagyobb termésbiztonság elérésének vágya volt a fő hajtóereje. Ezen kívánalmak közül, hol az egyik, hol a másik került előtérbe, miután a nemesítőknek bele kellett nyugodniuk, hogy egyszerre mindhárom cél nem teljesülhet. A kémiai növényvédelem – és ezen belül a kémiai gyomirtó szerek – eluralkodásával, pontosabban az ennek nyomán megjelenő herbicid rezisztencia következtében újabb nemesítési szempont jelent meg, mégpedig a rezisztens gazdasági növényfajták előállításának igénye. Ennek a törekvésnek a molekuláris nemesítési módszerek



hatékonyságának napjainkban tapasztalható robbanásszerű fejlődése adott igazán nagy lendületet. Az így előállított növényfajtákban azonban a kívánatos rezisztencia megjelenésével együtt a produktivitás vagy egyéb környezeti stressztűrési terén igen gyakran hátrányos tulajdonságok is megjelennek. Ez a mozgatórugója azoknak a kutatásoknak, amelyek a herbicid rezisztenciát kísérő ún. pleiotropikus hatások fiziológiai hátterének megismerését célozzák. A PSII-gátló gyomirtó szerek közé tartozó triazin típusú herbicidekkel szembeni rezisztenciát kísérő kisebb produktivitás és a nagyobb fényérzékenység jól ismert jelenség. Az atrazin rezisztencia mechanizmusát (oka a D1 protein 264-es pozíciójában pontmutációból adódó szerin→glicin aminosav csere) jó ideje ismerjük, de a pleiotrop jelenségek élettani részletei még jórészt felderítetlenek. Közéjük tartozik az elsőként az atrazin-rezisztens betyárkóróban (*Erigeron canadensis*) általunk észlelt gátolt xantofill-ciklus aktivitás is (Váradi et al. 1994), amelynek általánosítása kétszikű gyomok esetében munkám egyik fő célkitűzése volt, s amelynek része lehet az említett hátrányos tulajdonságok megjelenésében. A munkánk során kidolgozott és alkalmazott biofizikai mérési metodikák és jellemző paraméterek alkalmasak lehetnek gazdasági növények, így a szőlő stresszfiziológiai kutatására, a nemesítés során az előállított fajtajelöltek gyors, hatékony és egzakt jellemzésére, amely célkitűzésem további motivációját adta.

A fotoszintézis-gátló herbicidek a fotoszintézis folyamatainak valamely meghatározott lépését gátolják (mint például a triazin típusú gyomirtó hatóanyagok az elektrontranszport láncban a  $Q_A$  és  $Q_B$  plasztokinon komponensek közötti elektron átadást a  $Q_B$  kötőhelyének elfoglalása révén), vagy az elektronok normális úttól való eltérítésével (mint a paraquat esetében, gátolva ez által a  $CO_2$ -fixációhoz szükséges NADPH termelődését). Nem meglepő tehát, hogy e herbicidek hatásmódjának tanulmányozása, s nem kevésbé a velük szemben kialakult rezisztencia mechanizmusának kutatása során jelentős ismereteket szereztünk a fotoszintézis alapfolyamatairól is. Többszörösen bebizonyosodott, hogy e természetes mutánsok és a vad biotípusok módszeres összehasonlítása hatékony eszköz lehet az egyébként közvetlenül nehezen vagy egyáltalán nem vizsgálható elemi folyamatok felderítésében. Munkám célkitűzését illetően ez is alapvető jelentőséggel bírt. Szándékom és reményem szerint jelen dolgozatban leírtak is hasznos adalékul szolgálhatnak későbbi kiterjedtebb és mélyebb alapkutató jelentő munkákhoz.

A fény szerepe a paraquat hatásában régóta ismert, de a folyamat részletei – beleértve az elsődleges, elektron eltérítő és a másodlagos, szabadgyök képző hatásokat – még

korántsem teljesen ismertek. A paraquat rezisztencia mechanizmusával kapcsolatban még bonyolultabb a helyzet, hiszen az egymással versengő hipotézisek egyike mögött sincsenek a lényegét bizonyító, közvetlen kísérleti eredmények. Azt lehet mondani, hogy a paraquat rezisztencia mechanizmusának felderítése területén még az ismeret felhalmozás időszakát éljük. Habár célkitűzésemben nem szerepelt kifejezetten a paraquat rezisztencia mechanizmusának kutatása, nem zártam ki annak a lehetőségét, hogy a xantofill-ciklus és a fotoszintézis folyamatok paraquat jelenlétében általunk megfigyelt válaszai e mechanizmus felderítéséhez is további adalékul szolgálhatnak.

Tekintve, hogy dolgozatomban az egyik legfontosabbnak tartott fotoprotektív mechanizmus, a xantofill-ciklus működését kétféle herbicid hatóanyaggal (atrazinnal és paraquattal) szemben rezisztens mutáns biotípusokon mutatom be, a dolgozat első részében részletesen áttekintem a fény káros hatásaival és a védőmechanizmusokkal kapcsolatos szakirodalmat, majd ezt követően röviden ismertetem az atrazin rezisztencia és a paraquat rezisztencia mechanizmusával foglalkozó szakterület irodalmát is. A kétféle rezisztens mutánssal folytatott kísérletek eredményeit két elkülönült, nagyobb fejezetben, a diszkusszióval együtt fejtem ki a dolgozatban.

Szándékom és reményem szerint a herbicid-rezisztens mutánsok fotoprotektív mechanizmusairól megszerzett új ismeretek jól hasznosulnak majd termesztett növények stresszfiziológiai kutatásában, a stressztűrő növényfajták előállítását szolgáló nemesítési munkában és korai stresszdiagnosztikai eljárások kidolgozásában.



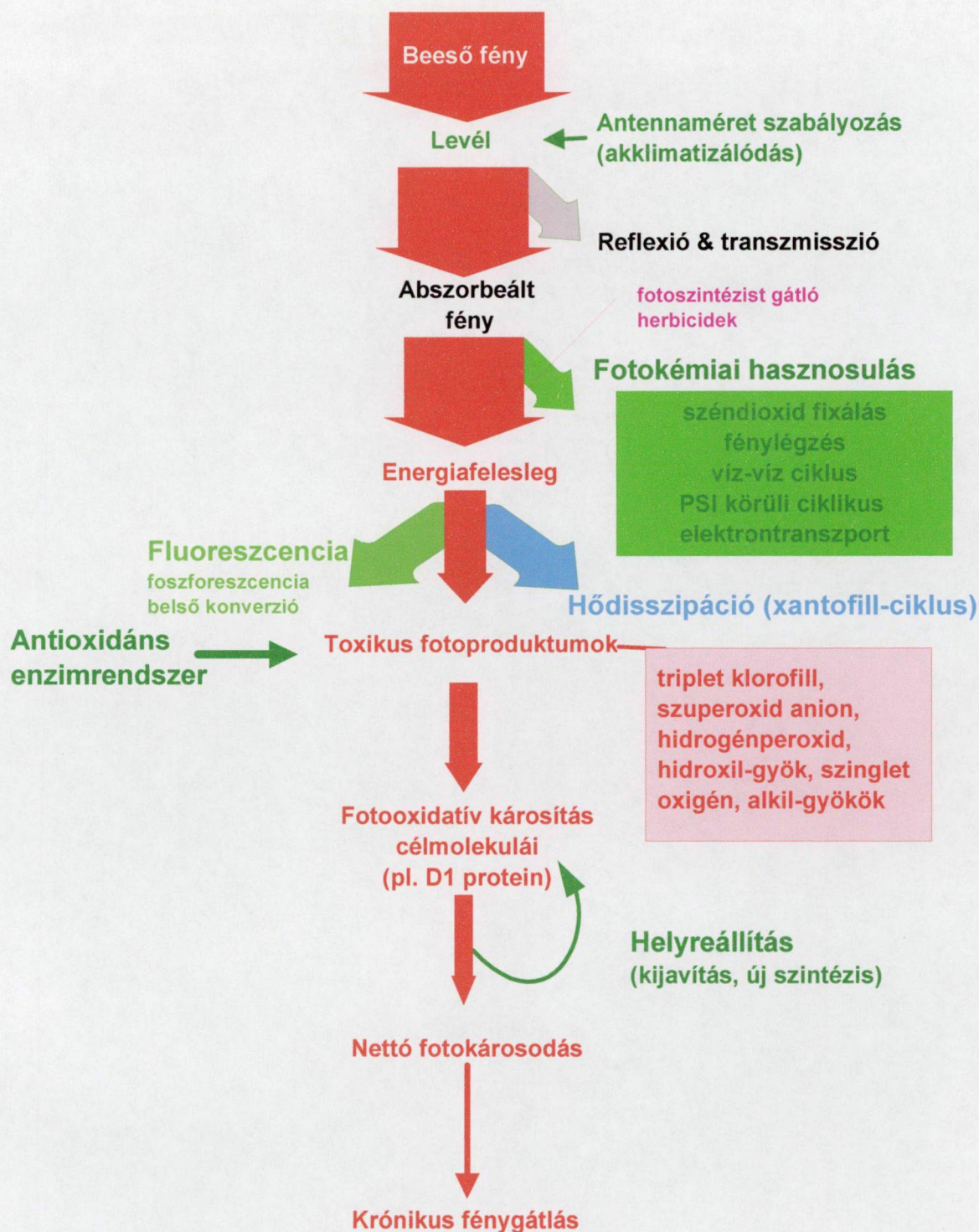
# **1. Szakirodalmi áttekintés**

## **1.1. A fény káros hatásai fotoszintetizáló növényekben**

A növényeket a napok többségében éri olyan intenzitású fény, amely meghaladja fotoszintetikus teljesítményüket, ezért a fény fotokémiai hasznosulási folyamata mellett olyan mechanizmusoknak is ki kellett alakulniuk, amelyek az adott élőhelyen előforduló, sokszor igen dinamikus fényintenzitás változások alkalmával jelentkező fényenergia fölösleget veszélytelen módon elvezetik a rendszerből. Az ilyen védőmechanizmusok teljesítőképességét a genetikai adottságokon túl az adott élőhelyen a növényt érő fényintenzitás maximumok határozzák meg. A zöld növények leveleit érő napsugárzás egy részét a fotoszintetikus pigmentek abszorbeálják, amelynek további sorsát a következő ábrán szemléltethetjük (1. ábra). A befogott fényenergia fotokémiaiilag nem hasznosuló része fölöslegként jelentkezik, s ez érthető módon a nagyobb fényintenzitások esetén ölthet súlyosabb mértéket. A gerjesztési energiafölség jelentős hányadát a fotoszintetikus apparátus erre szakosodott védőmechanizmusai képesek ártalmatlan módon, hő formájában disszipálni. A fölség ezek után is fennmaradó része viszont már káros folyamatokat eredményez, nevezetesen megnő a hosszabb (ms) élettartamú triplet gerjesztett állapotú klorofill keletkezésének gyakorisága, ami a mindenütt jelenlévő molekuláris oxigénnel reagálva fokozottabb mértékű szinglet oxigénképződést okoz. Ezen kívül oxigéntartalmú szabadgyökök (szuperoxid-anion, hidroxil-gyök), hidrogénperoxid, valamint szerves gyökök képződése tapasztalható. Mindezen toxikus fotoproduktumok különösen a telítetlen zsírsavakban gazdag tilakoid membránokat károsítják, rendszeres hatástalanításukat az ún. antioxidáns enzimrendszer végzi (Asada & Takahashi 1987).

### **1.1.1. Oxidáló molekulák keletkezése a fotoszintézisben**

Az oxigénes fotoszintézis – a reaktánsok és termékek közötti nagy redox potenciál különbségből adódóan és a gerjesztett közbenső állapotok részvétele következtében – a keletkező reaktív oxigénformák és más oxidáló molekulák miatt sajátos problémákat vet fel a fotoszintetizáló szervezetek számára. Ezért a védekezési, szabályozási mechanizmusok tárgyalása előtt célszerű áttekintenünk a fény károsító hatásainak formáit. A fotoszintetikus apparátusban főleg három helyen keletkeznek potenciálisan károsító molekulák: (1) a PSII fénygyűjtő komplexében, (2) a PSII reakciócentrumban és (3) a PSI akceptor oldalán.



**1. ábra**

A fotoszintetizáló növény levelét érő fotoszintetikusán aktív fény hasznosulásának és az energiafölség eliminálásának sematikus modellje.

A fényabszorpció alkalmával a klorofill molekula szinglet gerjesztett állapotba jut ( $^1\text{Chl}$ ), amelyből a gerjesztési energia rezonancia átvitel útján gyorsan ( $<\text{ps}$  időskálán) átjuthat a környező klorofill molekulákra. Bizonyos valószínűséggel, azonban triplet klorofill ( $^3\text{Chl}$ ) is képződhet (121), melynek hozama a  $^1\text{Chl}$  antennabeli élettartamától függ ( $>>\text{ns}$ ) (Foyer & Harbinson 1994). A keletkező  $^3\text{Chl}$  viszonylag hosszú élettartamú ( $>>\text{ms}$ ) lévén kölcsönhatásba léphet molekuláris oxigénnel, miáltal szinglet oxigén ( $^1\text{O}_2$ ) keletkezik (Foote 1976). Mivel a  $^1\text{Chl}$  élettartama a PSII antennában többszöröse, mint a PSI antennában, a  $^1\text{O}_2$  képződés a LHCII-ben jóval nagyobb.

A PSII reakciócentrumban a gerjesztési energia befogás részeként lezajló elsődleges töltésszétválasztás a P680 klorofill-dimer és a feofitin molekula részvételével, reverzibilis folyamatban egy szabadgyök-párt ( $\text{P680}^+/\text{Pheo}^-$ ) eredményez (Dau 1994, Schatz et al. 1988). Az itt bekövetkező rekombináció és a PSII-ben lehetséges egyéb visszaalakulások triplet P680 ( $^3\text{P680}$ ) keletkezéséhez vezethetnek (Andersson & Barber 1996, Aro et al. 1993, Ohad et al. 1994, Vass et al. 1992), amely éppúgy  $^1\text{O}_2$  képződést vált ki, mint az LHC esetében láttuk. A töltésszétválasztást követően a  $\text{Pheo}^-$ -ről a  $\text{Q}_\text{A}$  kinon akceptorra történő elektronátadás, majd a  $\text{P680}^+$  – a víz oxidációjából származó elektron felhasználásával történő – redukciója stabilizálja a reakciócentrumot. Jóllehet, a  $\text{P680}^+$  és az  $\text{Yz}^+$  (a D1 protein 161-es tirozinja) nagyon nagy oxidáló potenciálja lehetővé teszi a növény számára, hogy a vizet használja elektrondonorként, amennyiben e kation gyökök élettartama a megfelelő reakciópartnerek hiányában megnő, a  $\text{P680}^+$  és az  $\text{Yz}^+$  a szomszédos pigmentek és proteinek oxidálására is képes (Andersson & Barber 1996, Aro et al. 1993).

A PSI-ben szintén bekövetkezik a gerjesztést követő töltésszétválasztás ( $\text{P700}^+$  és  $\text{Chl}^-$  A0), majd az elektrontranszport (fillokinon A1 és az FX, FA és FB vas-kén centrumok) révén a stabilizálódás. A  $\text{P700}^+$  kevésbé erős oxidálószer és viszonylag stabil, viszont a PSI akceptor oldala, amely kellően negatív redoxpotenciálú a NADP ferredoxinon keresztüli redukációjához, képes a molekuláris oxigént is szuperoxid aniongyökké ( $\text{O}_2^-$ ) redukálni (Mehler 1951, Asada & Takahashi 1987). A fém-katalizálta Haber-Weiss vagy Fenton-reakció során a szuperoxidgyökből hidroxilgyök keletkezik, amely különösen mérgező reaktív oxigénforma (Fridovich 1983).

Ezek az oxidáló molekulák bármely fényintenzitáson jelen vannak, de a fotoszintetikus fényhasznosító kapacitást meghaladó fényintenzitás esetén fokozódik a fotooxidatív

károsodás lehetősége. A fent említett folyamatok következtében fényfőlősleg esetén fokozódik a  $^3\text{Chl}$  és a  $^1\text{O}_2$  képződés. Ezen túlmenően a túlzott megvilágításkor felépülő nagy  $\Delta\text{pH}$  gátolhatja az oxigénfejlesztő komplexről a  $\text{P680}^+$ -ra történő elektronátadást, növelve ezáltal a  $\text{P680}^+$  és/vagy az  $\text{Yz}^+$  élettartamát.

A PSI akceptor oldalának fényfőlősleg esetén bekövetkező túlzott redukciója kedvez a molekuláris oxigén szuperoxidgyökké történő redukciójának, amely a lumen savanyodással együtt szerepet játszik a fénygátlás kialakulásában (Hurry et al. 1996), amelyet később részletesebben bemutatok.

### **1.1.2. A fotooxidatív károsítás célpontjai**

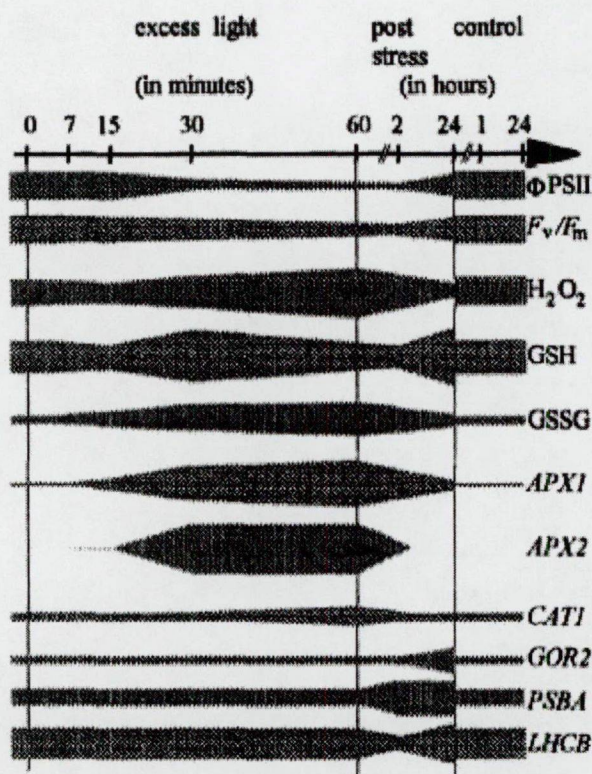
Habár a károsodás pontos mechanizmusa még nem ismert, a PSII tekinthető a fotooxidatív károsodás fő célpontjának (Anderson et al. 1998, Andersson & Barber 1996, Aro et al. 1993, Baroli & Melis 1998, Huner et al. 1998, Ohad et al. 1994, Park et al. 1995, Park et al. 1996a). Az LHC-n belüli  $^1\text{O}_2$  képződés a közvetlen környezetben található lipidek, proteinek és pigmentek oxidációjához vezethet (Knox & Dodge 1985). A tilakoid membrán lipidek különösen érzékenyek a szinglet oxigén okozta károsításra, mert oldalláncaikban jelentős arányban tartalmaznak telítetlen zsírsavakat. Az így keletkező hidroperoxidok peroxilgyökök láncreakciókat indítanak el a tilakoid membránban. A PSII reakcióközpontban keletkező  $^1\text{O}_2$  és/vagy  $\text{P680}^+$  lipideket, fontos pigment kofaktorokat és PSII-höz kapcsolt protein alegységeket, így különösképpen a D1 proteint károsíthatják, a teljes reakciócentrum fotooxidatív inaktiválódását okozva (Aro et al. 1993, Barber & Andersson 1992).

A PSI akceptor (sztróma felőli) oldalán a  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  és hidroxilgyökök ( $\text{OH}^\cdot$ ) okozta oxidatív károsítás lehetséges célpontjai közé tartoznak a fotoszintetikus szén-anyagcsere olyan kulcsenzimjei, mint a foszforibulokináz, a fruktóz-1,6-biszfoszfátáz és a NADP-gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (Asada 1994a, Kaiser 1979). Magának a PSI reakciócentrumnak a károsodásával összefüggő fénygátlást csak bizonyos körülmények között, például hidegstressz esetén tapasztalhatunk (áttekintését lásd: Sonoike 1996).



## 1.2. A fény káros hatásaival szemben kialakult védőmechanizmusok növényekben

A túlzott megvilágítás okozta fénystressz következtében kialakuló fénygátlás során megfigyelhető egyrészt a fotoszintetikus folyamatok hatásfokának romlása, másrészt egy sokrétű védekezési rendszer és helyreállító mechanizmusok aktiválódása. Ilyenre látunk példát a 2. ábrán egy 60 perces fénystressz ( $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) és az azt követő 24 órás relaxáció folyamataira (Karpinski et al. 1997).



### 2. ábra

Fénystressz okozta válaszreakciók időbeli rendje fotoszintetizáló levélben (Karpinski et al. 1997). A sötét sávok szélessége arányos a mért értékek nagyságával. ( $\Phi\text{PSII}$ , a PSII effektív kvantumhatásfoka;  $F_v/F_m$ , a PSII optimális kvantumhatásfoka; GSH és GSSG, redukált és oxidált glutation; APX1 és APX2, aszkorbát-peroxidáz mRNS; CAT1, kataláz mRNS; GOR2, glutation-reduktáz mRNS; PSBA, D1-protein mRNS; LHCB, PSII fénygyűjtő klorofill *a/b* kötő fehérje mRNS)

### 1.2.1. A fénygyűjtő antenna méretének szabályozása

A PSII és PSI klorofill antennák méretváltozásai a fényelnyelés és hasznosítás kiegyensúlyozásának részét képezik (áttekintését lásd: Anderson 1986, Melis 1991). A növénynevelési fénykörnyezethez való hosszútávú akklimatizálódás során az LHC-vel



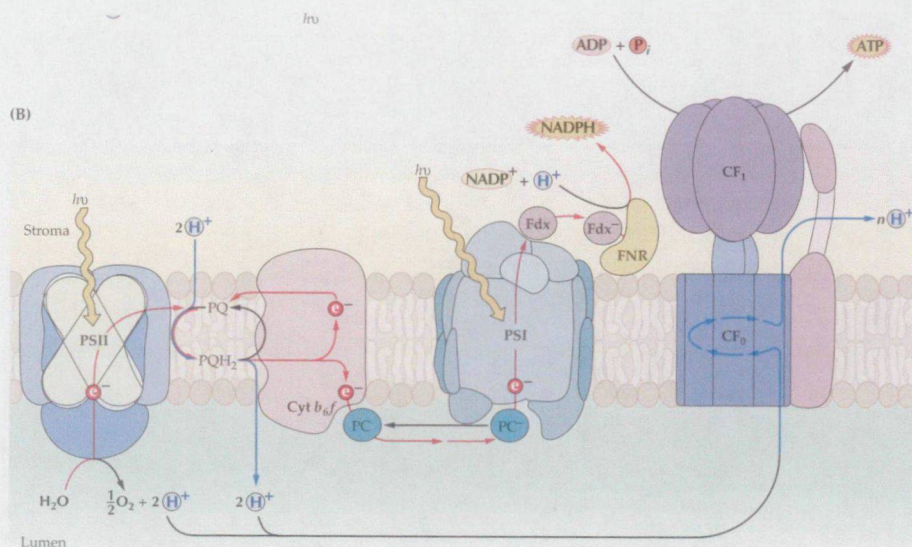
összefüggő génexpresszió megváltozása ([Escoubas et al. 1995](#), [Maxwell et al. 1995](#), [Walters & Horton 1994](#)) és/vagy az LHC proteinek lebomlása ([Lindahl et al. 1995](#)) játszhat szerepet.

A PSII és PSI relatív antenna méretek rövidtávú megváltozása az állapot átmenetek következtében jöhet létre. Az erre vonatkozó modell értelmében (lásd: [Allen 1995a](#)) a PSII-nek a PSI-hez képest mutatkozó viszonylagos túlgerjesztése csökkenti a plasztokinon készlet méretét és egy kinázt aktivál, amely a PSII-höz kapcsolódó perifériás LHC-t foszforilálja. Ennek a foszforilált LHC-nek az ezt követő leválása csökkenti a PSII antenna effektív méretét, s a foszforilált LHC a továbbiakban a PSI-re történő gerjesztési energiaátvitelben vesz részt. Habár ezt az átmenetet gyakran fotoprotektív folyamatként értelmezik (lásd pl.: [Anderson & Andersson 1988](#), [Aro et al. 1993](#)), fényvédő szerepét illetően – legalábbis fényfőlség esetén – nincsen meggyőző bizonyíték. Úgy tűnik, hogy az LHC-kináz rendszer erős megvilágítás esetén inaktiválódik ([Demmig et al. 1987a](#), [Rintamäki et al. 1997](#), [Schuster et al. 1986](#)).

### 1.2.2. A fotoprotekció fotokémiai útjai

#### 1.2.2.1. Asszimilációs célú lineáris elektrontranszport

Az LHC-k által elnyelt fényenergia jó része fotokémiai úton hasznosul, amely kiváltja a



### 3. ábra

Az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosulása a fotoszintézisben.



víztől NADPH-ig futó lineáris elektrontranszportot (3. ábra),  $O_2$  termelődést és a  $CO_2$ ,  $NO_3^-$  és  $SO_4^{2-}$  redukcióját eredményezve.

A fotoszintézis maximális sebessége dinamikus tulajdonság, amelyet az eltérő megvilágítási viszonyok mellett történő nevelés során lezajló akklimatizáció (áttekintését lásd: Björkman 1981, Chow 1994) enzimaktivitásokon és génexpresszióin keresztül képes módosítani. Ezek az akklimatizációs válaszok néhány napos időtartamúak és kevés molekuláris genetikai adat szól hosszabbtávú fotoprotekciós akklimatizálódásról.

#### **1.2.2.2. Oxigénfüggő elektrontranszport**

Számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy az oxigén felé irányuló nem-asszimilációs elektrontranszport fontos szerepet játszik a gerjesztési energiafőlösleg elfogyasztásában. Az oxigén elektronakceptorként funkcionál egyrészt a Rubisco által katalizált oxigenáz reakcióban (fénylégzés), másrészt a PSI akceptor oldala által történő közvetlen redukcióban (Mehler 1951) és sok vita folyik arról, hogy melyik folyamat fontosabb a fotoprotekció szempontjából (pl.: Biehler & Fock 1996, Heber et al. 1996, Osmond & Grace 1995, Park et al. 1996b, Wiese et al. 1998).

#### **Fénylégzés**

A  $C_3$ -as növényekben, különösen korlátozott  $CO_2$  ellátás esetén, a fotorespirációs oxigén metabolizmus jelentős mérvű lineáris elektrontranszportot és fényenergia hasznosulást képes fenntartani (áttekintését lásd: Osmond 1981). Az abnormalis glutamin-szintetáz aktivitást mutató transzgenikus növényekkel folytatott kísérletek megerősíteni látszanak, hogy a fénylégzés fontos szerepet játszik a fotooxidatív hatásokkal szembeni ellenállóképességben (Kozaki & Takeba 1996, Wallsgrove et al. 1987).

#### **Az oxigén PSI általi fotoredukciója**

Az  $O_2$  PSI általi közvetlen redukciója egy alternatív elektrontranszport út első lépése, amelyet többféleképpen, így pszeudociklikus elektrontranszportnak, Mehler-aszkorbát-peroxidáz reakciónak és víz-víz ciklusnak is elneveztek (áttekintését lásd: Asada 1999). Az  $O_2^-$ -t, amely a PSI akceptor oldalán a molekuláris oxigén redukciójával keletkezik, hatékonyan metabolizálják a tilakoidhoz kötött szuperoxid-diszmutáz (SOD) és aszkorbát-peroxidáz (APX) izoenzimek és a monodehidroaszkorbát reduktáz enzim,

melynek során  $\text{H}_2\text{O}$  és monodehidro-aszkorbát keletkezik, mely utóbbit a PSI képes közvetlenül visszaredukálni regenerálva az aszkorbátot (Asada 1994b, Asada 1994a, Asada 1999). Ílymódon a víz oxidációjából származó négy elektront a PSI elhasználja az oxigén vízzé történő redukciójában. Ez az ún. pszeudociklikus elektrontranszport út  $\Delta\text{pH}$ -t állít elő az ATP-szintézishez, de sem NADPH sem nettó  $\text{O}_2$  képződés nincsen. A fénylégzéshez hasonlóan a víz-víz ciklus is segíthet a gerjesztési energiának az elektrontranszport útján történő eltávolításában. Az azonban bizonytalan, hogy ez milyen mértékben járul hozzá az elektrontranszporthoz; algák és  $\text{C}_3$ -as növények esetében a normál elektrontranszport 10%-a és 30%-a közé teszik (Biehler & Fock 1996, Lovelock & Winter 1996, Osmond & Grace 1995). Ez az útvonal is része lehet a fölös elnyelt energia hődisszipációjához szükséges  $\Delta\text{pH}$ -t fenntartó folyamatoknak (Schreiber & Neubauer 1990).

#### **1.2.2.3. Ciklikus elektrontranszport**

A PSII-n belüli, feltehetően a citokróm  $b_{559}$ -et magába foglaló ciklikus elektrontranszport esetében is fölvetődött, hogy részt vesz a gerjesztési energia eltávolításában (áttekintését lásd: Chow 1994, Whitmarsh et al. 1994), de *in vivo* létezése meggyőzően nem bizonyított. A citokróm  $b_{559}$  a Pheo $^-$  oxidációja, vagy a  $\text{P680}^+$  redukciója révén védheti a PSII-t a fénykárosodástól (Whitmarsh et al. 1994).

A PSI körüli ciklikus elektrontranszportról szintén feltételezik, hogy fontos szerepet tölt be a fotoprotekcióban. Azon túlmenően, hogy a PSI által elnyelt energiát eltávolítja, a ciklikus elektrontranszport részt vehet a  $\Delta\text{pH}$  létrehozásában és fenntartásában, amely a fölös elnyelt fényenergia hődisszipációja által történő PSII szabályozáshoz (down-regulation) szükséges (Heber & Walker 1992).

#### **1.2.3. A károsító oxigénformák hatástalanítása**

Számos antioxidáns molekula és enzim rendszer működik a kloroplasztisban, amelyek képesek befogni a fotoszintézis által szükségszerűen termelt reaktív oxigénformákat (Asada 1994b, Foyer et al. 1994, Polle 1997). A túlzott megvilágításhoz való alkalmazkodás során számos esetben megfigyelték az antioxidáns molekulák és enzimek gyarapodását (lásd pl.: Grace & Logan 1996), melyeknek specifikus szerepét mutáns és transzgenikus élő szervezetek alkalmazásával kezdik felderíteni (Allen 1995b, Allen et al. 1997, Alscher et al. 1997, Foyer et al. 1994).

### 1.2.3.1. Antioxidáns molekulák

A xantofilleket is magukba foglaló **karotinoidok** membránhoz kötött antioxidánsok, amelyek kioltják a  $^3\text{Chl-t}$  és a  $^1\text{O}_2\text{-t}$ , gátolják a lipidek peroxidációját és stabilizálják a membránokat (áttekintését lásd: Demmig-Adams et al. 1996b, Frank & Cogdell 1993, Frank & Cogdell 1996, Havaux 1998).

A tilakoid membránban előforduló másik fontos antioxidáns az  **$\alpha$ -tokoferol**, amely fizikai úton kioltja vagy kémiai úton befogja a  $^1\text{O}_2\text{-t}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -t és a  $\text{OH}^{\cdot}$ -t a membránban, meggátolva ezáltal a lipidek peroxidációját (Foyer et al. 1994). Míg a karotinoidok többnyire proteinekhez kötődnek, az  $\alpha$ -tokoferol a membrán lipidmátrixában szabadon fordul elő és úgy tűnik, szerepe van a membrán fluiditásának és stabilitásának szabályozásában (Fryer 1992). Ráadásul, az  $\alpha$ -tokoferol hatékonyan véget vet a lipidperoxidáció láncreakcióinak, miközben  $\alpha$ -kromanoil-gyök képződik belőle (Fryer 1992).

Az **aszorbát** egy vízzoldékony antioxidáns, amely – a  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  és a  $\text{OH}^{\cdot}$  közvetlen kioltásával/befogásával, az  $\alpha$ -tokoferolnak  $\alpha$ -kromanoil-gyökből történő regenerálásával és a violaxantin de-epoxidáz (VDE) valamint az APX reakciók szubsztrátjaként – központi szerepet tölt be az oxidatív károsodások kivédésében (Noctor & Foyer 1998, Smirnoff 1996). Habár az aszorbát nagy mennyiségben ( $>>25\text{mM}$ ) fordul elő a kloroplasztisban, növényekben csak nemrég derítették fel az aszorbát bioszintézis útját (Wheeler et al. 1998), és az aszorbát fotoprotekcióban betöltött szerepét még kevéssé ismerjük. Aszorbát-hiányos *Arabidopsis* mutáns (*vtc1*) esetében fokozott érzékenységet tapasztaltak ózonnal,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel,  $\text{SO}_2$ -vel és UV-B sugárzással szemben (Conklin et al. 1996, Conklin et al. 1997). Az aszorbáthiányos és csökkent NPQ-t mutató *vtc2 Arabidopsis* mutáns aszorbát bevitel hatására a vad típushoz közeli xantofill-ciklus de-epoxidációt és NPQ kialakulást mutatott (Müller-Moulé et al. 2002). Az aszorbáthiányos *vtc1 Arabidopsis* mutáns esetében vízhiánnyal kombinált fénystressz esetén fokozott lipidperoxidációt figyeltek meg (jelentősen csökkenő  $\alpha$ -tokoferol koncentráció mellett kb. 60%-kal több malondialdehid termelődött), amelyet aszorbát adagolással meg tudtak akadályozni (Munné-Bosch & Allegre 2002).

További vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az aszorbát tartalom nem csak a növények védelmi rendszerét meghatározó, hanem a hormonális szabályozást érintő, növekedést szabályozó gének átíródását is modulálhatja (Pastori et al. 2003).

A fotoszintézissel kapcsolatos gének expressziójának vizsgálata azt mutatta (Kiddle et al. 2003), hogy az aszkorbáhiány a *vtc1* mutánsban nem befolyásolta a fotoszintetikus teljesítményt. Aszkorbát bevitellel 14-szeresére növelve a levelek aszkorbátkoncentrációját 495 különféle transzkript előfordulása változott meg. A legújabb eredmények alapján érzékelhető, hogy az aszkorbát fontos része a redox szabályozású reakcióutak közötti metabolikus párbeszédnek és előfordulása információt nyújt a fotoszintézist és növényi védelmi rendszerek szabályozását koordináló redox pufferekapacitásról.

Másik fontos vízoldható antioxidáns a kloroplasztiszban a glutation, amely képes detoxifikálni a  $^1\text{O}_2$ -t és a  $\text{OH}^{\bullet}$ -t. A glutation megóvjá a sztrómában lévő enzimek tiol-csoportjait és részt vesz az  $\alpha$ -tokoferol regenerálásában és a glutation-aszkorbát cikluson keresztül az aszkorbát regenerálásában (Asada 1994a, Foyer et al. 1994).

#### **1.2.3.2. Enzimatisz bafogás**

A SOD és APX enzimek részt vesznek a kloroplasztiszban a reaktív oxigénformák befogásában. Az  $\text{O}_2$  PSI általi közvetlen redukciója során keletkező  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t a SOD  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vé alakítja, amelyet az APX  $\text{H}_2\text{O}$ -vé alakít, miközben monodehidro-aszkorbát gyök keletkezik. Ezt a PSI (a ferredoxin útján) a víz-víz ciklusban közvetlenül visszaredukálja (Asada 1999). Az aszkorbát a sztrómában is regenerálódhat a glutation-aszkorbát ciklust alkotó enzimek segítségével (Asada 1994a, Foyer et al. 1994).

A SOD és az APX egyaránt többféle izoform változatban fordul elő a kloroplasztiszban. A SOD esetében ezek az izoenzimek az aktív helyen található fémkomponens alapján osztályozhatók (Bowler et al. 1994). A legtöbb növényben a kloroplasztisz FeSOD-ot és Cu/ZnSOD-ot tartalmaz, míg az algák többségéből hiányzik a Cu/ZnSOD (de Jesus et al. 1989). A tilakoidhoz kötött SOD (Ogawa et al. 1995) és APX (Miyake & Asada 1992) a képződés helyén hatékonyan detoxifikálhatja a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t és a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t (Asada 1994a, Foyer & Harbinson 1994) és megakadályozhatja a Calvin-ciklus enzimjeinek inaktiválódását (Kaiser 1979). A SOD és az APX oldható formái a tilakoid membránból a sztrómába diffundáló  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -val és  $\text{H}_2\text{O}_2$ -val lép reakcióba.

A SOD és APX fokozott expressziója megfigyelések szerint okozhatja a fénystresszel és általában az oxidatív stresszel szembeni tolerancia erősödését (Sen Gupta et al. 1993a, Sen Gupta et al. 1993b, Pastori & Trippi 1992).

#### **1.2.4. A elnyelt fényenergia fölőleg termikus disszipációja, a nem-fotokémiai kioltás**

Fényfölőleg esetén a tilakoidális  $\Delta pH$  növekedése a fölő elnyelt fényenergia hődisszipáció formájában történő eltávolításának bekapcsolása révén szabályozza a PSII fénygyűjtő folyamatait (áttekintését lásd: Björkman & Demmig-Adams 1994, Demmig-Adams 1990, Demmig-Adams & Adams 1992a, Demmig-Adams & Adams 1996, Demmig-Adams et al. 1996b, Gilmore 1997, Horton et al. 1994, Horton et al. 1996). Az elnyelt fotonoknak több mint 75%-a eliminálható ezzel a xantofill-ciklus aktivitásával összefüggő mechanizmussal (Demmig-Adams et al. 1996a), amely magába foglalja a  $^1\text{Chl}$  gerjesztési energiájának lecsengetését és amelyet a klorofill fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltásával (NPQ), pontosabban az NPQ qE komponensével jellemezhetünk. A termikus disszipáció többféle módon védheti a fotoszintetikus apparátust: (1) a PSII LHC-ben és reakciócentrumban csökkenti a  $^1\text{Chl}$  élettartamát, minimalizálva ezzel a  $^1\text{O}_2$  képződést, (2) megakadályozza a lumen túlsavanyodását és a hosszú élettartamú  $\text{P680}^+$  létrejöttét, és (3) csökkenti a molekuláris oxigén PSI általi redukciójának mértékét. A nem-fotokémiai kioltás másodperces vagy perces nagyságrendben reverzibilis és xantofill- ciklus függő. Legtöbb esetben a nem-fotokémiai kioltás gyors reverzibilitású,  $\Delta pH$ -függő qE-nek nevezett komponense a meghatározó. A nem-fotokémiai kioltás lassan relaxálódó qI komponensét fénygátlásként ismerjük, amely lényegében egy fotoprotektív mechanizmusnak is tekinthető (Demmig-Adams et al. 1998, Horton et al. 1996, Jahns & Mische 1996, Krause 1988, Öquist et al. 1992).

##### **1.2.4.1. A xantofill-ciklus működése magasabb rendű növényekben**

A xantofill-ciklus minden eddig megvizsgált magasabb rendű növény fotoszintetikus apparátusában megtalálható. Az Osmond szerint (Osmond 1994) az ún. dinamikus fénygátlás során a xantofill-ciklus működése kellő védelmet képes nyújtani a fotoszintetizáló levél számára. A dinamikus fénygátlás egyik fő ismérve az, hogy a fotoszintetikus teljesítmény reverzibilisen képes követni a fényintenzitás időbeli változásait. Ezzel szemben az ún. krónikus fénygátlásra jellemző, hogy az már érinti a PSII reakciócentrum működését, különösképpen a centrum funkcionális integritását. Kémiaailag a xantofill-ciklus három egymásba átalakuló komponensből, a di-epoxid violaxantinból (VIO), a mono-epoxid anteraxantinból (ANT) és a de-epoxidált forma zeaxantinból (ZEA) áll (4. ábra). Az alapjelenséget, a VIO koncentráció fény hatására történő csökkenését és egy másik – akkor még a luteinnek tartott – xantofill molekula



gyarapodását, elsőként Sapozhnikov csoportja figyelte meg magasabb rendű növények (a *Polygonum sacchalinese* F. Schmidt, a *Cyclamen persicum* L., a *Vicia faba* L. és a *Taraxacum officinale* L.) leveleiben (Sapozhnikov et al. 1957, Sapozhnikov & Bazhanova 1958). Feltételezték, hogy a jelenségnek a fotoszintetikus oxigénfejlődésben lehet szerepe. A kromatográfiás módszerek fejlődése később lehetővé tette annak megállapítását, hogy a megvilágítás hatására képződő végtermék valójában a ZEA, amely az ANT nevű közbenső terméken át képződik és kiderült a folyamat ciklus jellege is (Yamamoto et al. 1962, Yamamoto 1979). Azt is megállapították, hogy a ZEA képződést a violaxantin VDE (VDE), míg a visszaalakulást a zeaxantin epoxidáz (ZE) enzim katalizálja (Siefermann & Yamamoto 1975a), de a ciklus élettani szerepéről sokáig nem volt használható elképzelés.

A fotoszintézis elméletének fejlődése, és a klorofill fluoreszcencia indukciós mérőmódszer korszerűsödése, a modulációs mérés technika bevezetése lehetővé tette, hogy kvantitatív képet nyerjünk az elnyelt fényenergia fotokémiai és nem-fotokémiai továbbalakulásáról (Schreiber et al. 1986). Ez tette lehetővé a xantofill-ciklus működése és az ún. nem-fotokémiai kioltás jelensége közötti összefüggés felismerését, amely mostanára általánosan elfogadott nézetté vált. Demmig, Björkman és munkatársaik (Demmig et al. 1987b, Björkman 1987) felismerték, hogy a xantofill-ciklus pigmentjeinek egymásba alakulása elektrontranszport függő, és a dinamikus fénygátlás jelenségéhez kapcsolható (Osmond 1994).

Időközben izolálták és jellemezték a VDE-t (Hager & Perz 1970, Yamamoto et al. 1974, Yamamoto & Higashi 1978) és később ZE aktivitást figyeltek meg LHCII preparátumon (Gruszecki & Krupa 1993a,b). A VDE izolált tilakoidokban (Yamamoto & Kamite 1972), oldatban (Siefermann-Harms 1977) és intakt levélben (Bilger et al. 1989) egyaránt reverzibilisen gátolható a ditiotreitol (DTT) nevű szulfhidril reagenssel, ezért feltételezték, hogy diszulfid-hidat tartalmaz. Kimutatták, hogy a VDE monogalaktozil-digliceridet tartalmaz, amely a tilakoid membránok fő lipid komponense, s a maximális turnover ezen lipidek és a VIO arányától függ (Yamamoto et al. 1974, Yamamoto & Higashi 1978).

Hager (1969) megállapította, hogy a VDE aktivitás izolált kloroplasztiszokban pH 4.8, izolált enzim esetében pH 5.2 értéknél optimumot mutat. A VIO de-epoxidációja folyamatosan nyomon követhető az 505 nm-en mérhető abszorpcióváltozással (Siefermann and Yamamoto 1974, 1975). Ennek segítségével megállapították, hogy a de-epoxidáció elsőrendű kinetika szerint megy végbe. A VDE aktivitás pH-függésére az



505 nm-es abszorpcióváltozás elsőrendű sebességi állandójával nyert adatok szerint (Pfündel & Dilley 1993) az aktivitás 6.3-as pH érték fölött már zérus és a maximális értékeket 5.8-asnál kisebb pH értéknél találjuk. A VDE aktivitás *in vivo* szabályozása tehát nagyon szűk pH-intervallumban történhet, amely lehetővé teszi a ZEA képződés beindítását pontosan annál a pH-nál, amelynél a rendszer az ATP-szintézis iránti igényt túllépi. Egy ilyen mechanizmus megfelelne egy megvilágítástól függő kapcsolónak, amely kismérvű  $\Delta pH$  változás esetén megnövelné a fölösleges fényenergia nem-radiatív úton történő disszipációját (Foyer et al. 1990).

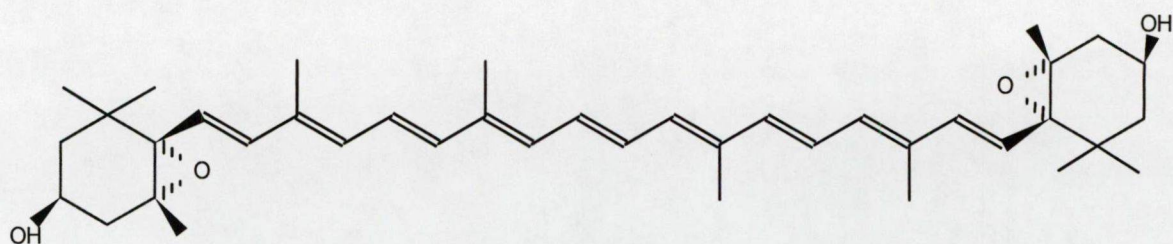
A pH által történő szabályozás mellett az aszkorbát jelenléte alapvetően fontos a VIO de-epoxidációjához. Izolált kloroplasztiszokban a fény által indukált de-epoxidáció 16 mM aszkorbát koncentrációnál futott telítésbe (Siefermann and Yamamoto 1974) és 3.1 mM aszkorbát esetén a maximális érték felét mutatta (Neubauer & Yamamoto 1994). Az aszkorbát koncentrációja 10 és 25 mM között volt megfigyelhető kloroplasztiszokban (Foyer et al. 1983, Gillham & Dodge 1986, Foyer et al. 1989, Schöner & Krause 1990). Ezek alapján egy aszkorbát hiány nem tűnik *in vivo* általános de-epoxidáció gátlónak, bár újabban mesterséges hiánymutáns biotípusokban kimutatták a súlyos aszkorbát hiány ilyen értelmű hatását (Müller-Moulé et al. 2002). Smirnoff (2000) aszkorbát-hiányos *Arabidopsis* mutánsokkal végzett kísérleteinek eredményei alátámasztják azt a korábbi feltételezést, hogy a tilakoid lumenben az aszkorbát ellátás potenciálisan korlátozó tényezője lehet a VDE aktivitásnak (Neubauer & Yamamoto 1994). Miután egy viszonylag kismérvű aszkorbát koncentráció csökkenés a lumenben csökkentette a VDE aktivitást (Smirnoff 2000), feltehető, hogy a lumenbeli aszkorbát koncentráció közel esik az enzim  $K_m$  értékéhez (100  $\mu M$ ), s nem a sztrómabeli koncentrációhoz (20-50 mM) hasonlít.

A de-epoxidáció mértéke függ a VIO hozzáférhetőségétől is, amely Siefermann & Yamamoto (1974, 1975) következtetései szerint a plasztokinon (PQ) pool relatív oxidált állapota esetén csökken. Ennek a feltételezett regulációs mechanizmusnak nincsen további kifejtése az irodalomban. Valószínű, hogy a VIO egy része a de-epoxidációban nem vehet részt, a ciklusnak nem része, mert pigment-protein komplexekben van elrejtve (5. ábra). A potenciálisan hozzáférhető VIO jelenti a VDE által konvertálható részt, amelyre a feltételezett redox szabályozás vonatkozik.

Egy újabb modell szerint (Dilley et al. 1987, Dilley 1991, Pfündel et al. 1994, Ewy & Dilley 2000) a fényintenzitás növelésével a lumen pH csökkenésében két szakasz különíthető el, melyeket lokalizált és nem lokalizált lumen savanyodásnak neveztek el.

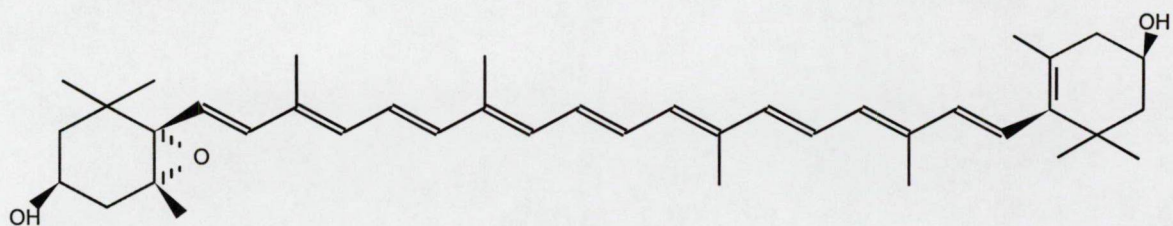
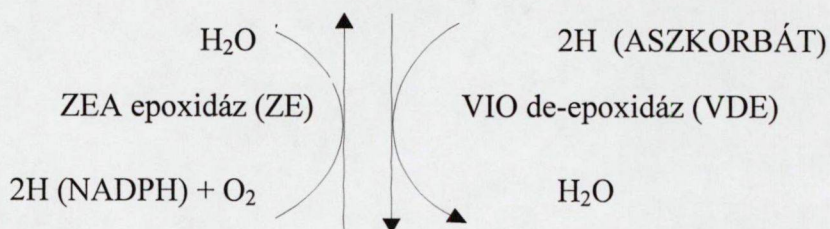
Feltehető, hogy nem közvetlenül a PQ készlet redox állapota tölt be regulátor szerepet a VIO hozzáférhetőség meghatározásában, hanem a lumen savanyodás ún. lokalizált szakasza játszik szerepet. A xantofill-ciklus fény-indukálta átalakulását izolált borsó kloroplasztiszokban hosszabb időn át ( $\geq 1$ óra),  $A_{505}$  abszorpcióváltozás mérésével nyomonkövetve megállapították, hogy kétfázisú lefutást mutat külön-külön elsőrendű kinetikával, amelyet két elkülönült, eltérő hozzáférhetőségű VIO készlet létezésével magyaráztak (Pfündel & Dilley 1993). Az első, gyorsabb fázisban mintegy kétszer annyi VIO alakult át, mint a lassú második szakaszban. 1 óra elteltével az összes VIO mintegy 25%-a megmaradt és ez további megvilágítás hatására sem alakult át ANT-ná vagy ZEA-ná. A VIO enzimatis de-epoxidációja gátolható ditiotreitől (DTT) segítségével (Yamamoto & Kamite 1972). Ez a szulfhidril-reagens – intakt levelekben (Bilger et al. 1989) és izolált kloroplasztiszokban (Demmig-Adams et al. 1990) egyaránt – ugyancsak jelentős mértékben gátolja az NPQ kialakulását is. Egy másik NPQ összetevő figyelhető meg azonban ZEA távollétében is, amely DTT-vel nem gátolható (Bilger et al. 1989, Demmig-Adams et al. 1990). Ezt konstitutívnak nevezték, mert független volt a VDE aktivitástól (Gilmore & Yamamoto 1991). Feltételezték, hogy a ZEA mintegy aktivátorként vesz részt az NPQ kialakulásában, de ellentmondásos eredményekről számoltak be a tekintetben, hogy a ZEA és az NPQ között csak nem-telítési  $\Delta pH$  mellett (Rees et al. 1989, Noctor et al. 1991), vagy telítési  $\Delta pH$  esetén is (Gilmore & Yamamoto 1991, 1993a,b) megfigyelhető az egyenes arányosság. Korábbi tanulmányokban az ANT-t nem vették tekintetbe, vagy csak feleannyi hatékonyságúnak tekintették a ZEA mellett a kioltási folyamatokban (Bilger & Björkman 1990). Gilmore & Yamamoto (1993a) kimutatta, hogy az ANT a "konstitutív kioltó" és ez metilviologén elektron akceptor jelenlétében éppolyan hatékony a tilakoidokban, mint a ZEA. Intakt kloroplasztiszon végzett részletesebb vizsgálatok alapján Neubauer (1993) arra a következtetésre jutott, hogy 1mM DTT koncentrációig az NPQ gátlása főként a VIO de-epoxidáció gátlásával korrelál, míg nagyobb DTT koncentrációk esetén már ehhez a hatáshoz társul a Mehler-aszskorbát peroxidáz reakció gátlásából fakadó NPQ-gátlás is.

A ZE enzimről kevesebbet tudunk, működésének körülményeit izolált kloroplasztiszon elsőként Hager (1975) és Siefermann & Yamamoto (1975b) vizsgálták. Megállapították, hogy kofaktorként NADPH-t és  $O_2$ -t igényel és aktivitásának fenntartásához ebben a rendszerben zsírmintesített BSA jelenlétére is szükség van



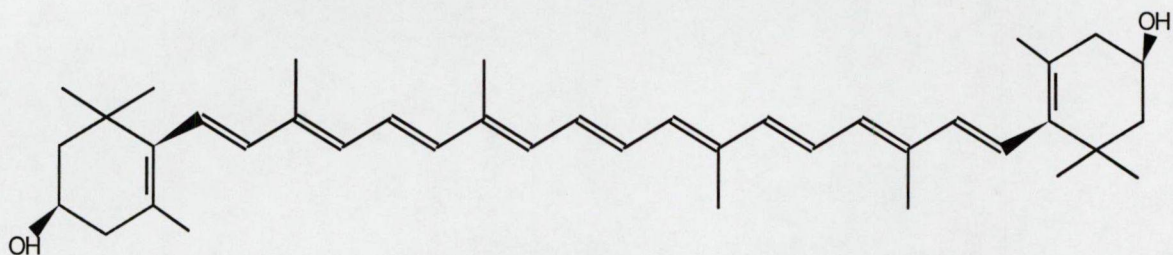
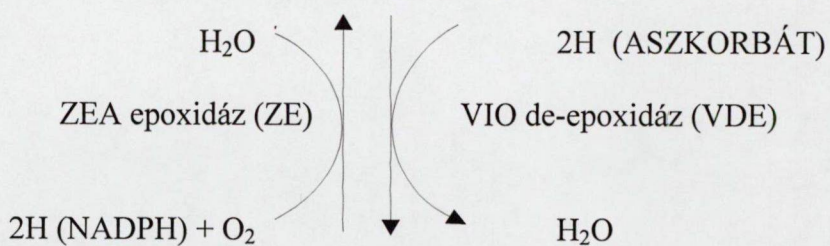
violaxantin (VIO)

(3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-5,6,5',6'-Diepoxi-5,6,5',6'-tetrahydro- $\beta,\beta$ -karotin-3,3'-diol)



antheraxantin (ANT)

(3S,5R,6S,3'R)-5,6-Epoxi-5,6-dihidro- $\beta,\beta$ -karotin-3,3'-diol)



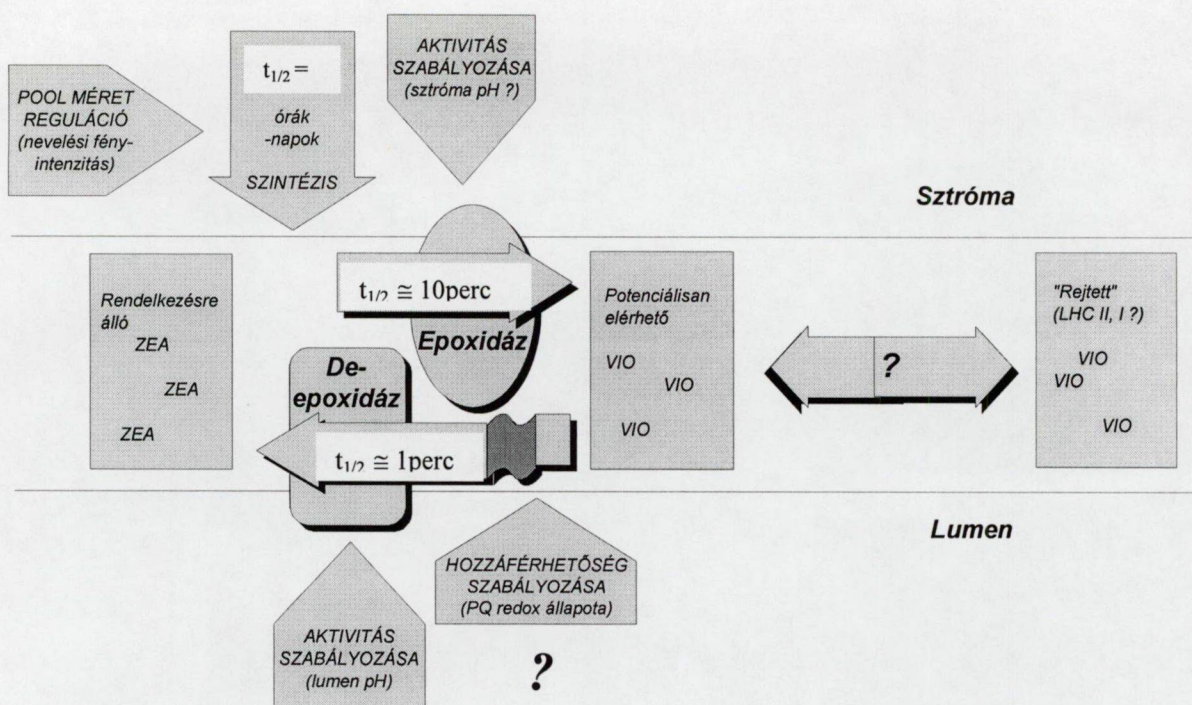
zeaxantin (ZEA)

(3R,3'R) - $\beta,\beta$ -karotin-3,3'-diol)

#### 4. ábra

A xantofill-ciklus komponenseinek egymásba alakulása.





## 5. ábra

A xantofill-ciklus regulációja (Pfündel & Bilger (1994) nyomán)

(Siefermann & Yamamoto 1975b). A ZE enzimet mostanáig még nem izolálták. Érdekes viszont, hogy izolált LHCII-ben megfigyeltek ZEA epoxidációs aktivitást (Gruszecki & Krupa 1993a,b).

Az általánosan elfogadott séma szerint a lumen savanyodása egyrészt aktiválja a VDE enzimet, beindítva a ZEA felhalmozódást, másrészt a PSII fehérjék protonálódása és ugyanitt a ZEA bekötődése oly módon változtatja meg az antenna konformációját, amely lehetővé teszi a gerjesztési energia hatékony kioltását a reakciócentrumokba történő energia átvitel és befogás helyett (Horton et al. 1991, 1996, Gilmore 1997, Gilmore et al. 1998). Újabban az *Arabidopsis thaliana npq4*-es mutánsának izolálása és jellemzése során kimutatták a PSII PsbS fehérje alegységének az NPQ kialakulásában való kötelező részvételét (Li et al. 2000, Li et al 2002a, Li et al 2002b).

Az NPQ folyamatban betöltött szerepükön túl a xantofillek antioxidánsként és a fénygyűjtő komplexek (LHC) komponenseként is fontos szerepet tölthetnek be. A xantofillek és általában a karotinoidok triplet klorofill és szinglet oxigén kioltó szerepe évtizedek óta ismert (lásd a Demmig-Adams et al. 1996b és Frank & Cogdell 1996 áttekintő cikkeket). Ezeket az antioxidáns funkciókat olyan karotinoidok mutatják,

amelyek LHC proteinek integráns szerkezeti komponenseiként vannak megkötve (Croce et al. 1999b), megfelelő fehérje hajtogatottságot és stabilitást biztosítva (Bassi et al. 1999). A lipid membránokban is előfordulhat viszonylag csekély mennyiségű szabad xantofill készlet, amelyről feltételezik, hogy a nagyon telítetlen tilakoid membránok lipid peroxidációval szembeni védelmében vesznek részt (Havaux 1998).

Már korábban fölvetődött annak a lehetősége, hogy a ZEA mellett annak szerkezeti izomerje, a lutein is közvetlen szerepet tölt be a hődisszipációban (Gilmore & Yamamoto 1990). Legújabbán beigazolódni látszik, hogy – legalábbis egyes növényfajokban – nem csak a xantofill-ciklusban keletkező ZEA, hanem a lutein is szerepet játszik az NPQ kialakulásában (Gilmore & Yamamoto 1993a, Gilmore et al. 1998, Gilmore 2001, Niyogi et al. 1997a, 1998, Pogson et al. 1998.), például a *Quercus* nemzetségben és fagyöngy (*Amyema miquelii*) esetében (Matsubara et al. 2001).

### **A xantofill-ciklus napi működése**

Számos magasabb rendű növényfaj egyedeinek levelei, amelyek nem képesek fénykerülő levélmozgásokra a nap folyamán a PAR drámai növekedését és csökkenését élik meg napnak kitett helyen felhőtlen, de még inkább a változóan felhős napokon, vagy a napfény foltoknak kitett aljnövényzet esetében. A növényfajok fotoszintetikus kapacitása jelentősen eltérő: a nagy fotoszintetikus teljesítményű napraforgó például a déli órákban az abszorbeált fényenergia 40-50 %-át is képes hasznosítani, míg az örökzöld évelő *Vinca major* esetében ez mindössze 10-20 % lehet. Ez azt jelenti, hogy a PAR fölösleg, amelyet az elnyelt és a hasznosított fényenergia különbségeként definiálhatunk, növényfajonként jelentősen különbözhet.

Természetes körülmények között a nap folyamán a levelekben igen jelentős változások mennek végbe a xantofill-ciklus aktivitásában (Adams et al. 1992, Adams & Demmig-Adams 1992, Björkman & Demmig-Adams 1994, Váradi et al. 1992). A nap folyamán a napsugárzás intenzitásának növekedésével a VIO a levelekben ANT-ná és ZEA-ná konvertálódik, a délutáni időszakban pedig a fényintenzitás csökkenésével fokozatosan visszaalakul VIO-ná. Ezek a változások a levélre ténylegesen beeső fény intenzitásával mutatnak szoros összefüggést. E tekintetben az egyes levelek eltérően megvilágított felületrészei is a tényleges fényviszonyoknak megfelelően viselkednek.

A xantofill-ciklus összetevőinek fényintenzitás-függő interkonverziója erős korrelációt mutat a klorofill fluoreszcencia indukciós elemzésekkel a fényenergia fölösleg elvonás jellemzésére kalkulált nem-fotokémiai kioltás (NPQ, Bilger & Björkman 1990) és más,

összetettebb paraméterek (Demmig-Adams et al. 1996a) alakulásával, melynek alapján a ciklus illetve a ZEA kulcsszerepét feltételezik az energia disszipációs folyamatokban.

### **A levelek fény-árnyék akklimatizációja**

Az eltérő fényviszonyok között kifejlődő levelek különböznek alaktani, szövettani szempontból, klorofill tartalmukban és fotoszintetikus teljesítményükben. Az akklimatizáció magába foglalja a fotoszintetikus elektrontranszport, az ATP szintézis és a fotoszintetikus szén asszimiláció megváltozott teljesítményét (lásd pl. Anderson et al. 1988 áttekintő dolgozatát), azonban egyetlen olyan növény sem létezik – beleértve a nagyon intenzíven fotoszintetizáló termesztett növényeket is – amely kellőképpen tudná fokozni fotoszintetikus kapacitását a teljes napfénynek megfelelő PAR maradéktalan fotoszintetikus hasznosításának elérésére (Björkman & Demmig-Adams 1994, Demmig-Adams et al. 1995). Ráadásul, amikor az erős megvilágítás más stresszhatásokkal (vízhiány, nitrogénhiány, alacsony hőmérséklet, stb.) együtt jelentkezik, a maximális fotoszintetikus teljesítmény gyakran leromlik. Ilyen körülmények között a fényvédő mechanizmusok szerepe még fokozottabb, hiszen a fényenergia fotokémiai hasznosulása csökken, miáltal ugyanazon beeső, illetve abszorbeált PAR még nagyobb része jelentkezik fölöslegként (Demmig-Adams & Adams 1992a, Demmig-Adams et al. 1996a, Demmig-Adams et al. 1997).

Egy növényfajon belül a növekvő PAR a xantofill-ciklus készletének (VIO+ANT+ZEA) növekedését eredményezi a klorofillhez vagy a többi karotinoidhoz viszonyítva. Az ún. "napfény növények" a nagyobb energia disszipációs igényüket egyrészt a nagyobb VIO+ANT+ZEA készlet (Thayer & Björkman 1990, Demmig-Adams & Adams 1992b), másrészt több ANT+ZEA felhalmozásával (Brugnoli et al. 1994, Demmig-Adams et al. 1995) biztosítják. Az összes karotinoid közül a VIO+ANT+ZEA készlet mutatja messze a legnagyobb mérvű fény-indukálta százalékos növekedést. A ciklus készletének fényviszonyoktól függő változása viszonylag gyors. Szőlővel végzett modellkísérletben például 3-5 nap alatt lezajlott (Váradí et al. 1998b) a xantofill-ciklus akklimatizációja.

Gyorsan és gyakorta változó fénykörnyezetben (modellkísérletben, vagy aljnövényzet esetében a napfény foltosság következtében) kimutatták, hogy a PAR növekedésekor a VIO de-epoxidációja nagyon gyors, akár percek alatt teljessé válik, míg árnyékba visszakerülve az epoxidációs folyamat lényegesen hosszabb időt vesz igénybe (Yamamoto 1979, Bilger & Björkman 1990, Demmig-Adams et al. 1997). Jól

kimutatható viszont, hogy az NPQ sokkal gyorsabban, másodpercek alatt követi a fényintenzitás változásait. Ez arra utal, hogy egyrészt az ANT+ZEA jelenléte önmagában nem elegendő feltétele az NPQ kialakulásának, másrészt a gyorsan változó fény-indukálta  $\Delta pH$  változások modulálják a xantofill-ciklus függő energia kioltást (Demmig-Adams et al. 1997).

### **Környezeti stresszhatásokra adott válasz**

Amikor a növényeket olyan környezeti stresszhatás éri, amely csökkenti a fotoszintetikus elektrontranszport sebességét, az abszorbeált fénynek csak kisebb hányada hasznosulhat a fotoszintézisben, ezáltal még nagyobb PAR fölösleget okozva. Súlyos stressz esetén még a máskülönben gyengének tekinthető fényintenzitás is nagy PAR fölöslegnek számíthat. Többek között a nitrogénhiány (Khamis et al. 1990, Demmig-Adams et al. 1995), a vas csökkent hozzáférhetősége (Morales et al. 1994) és a hidegstressz (Bilger & Björkman 1991, Adams & Demmig-Adams 1994, 1995, Adams et al. 1995a, b) esetében kimutatták a xantofill-ciklus készletének növekedését és a de-epoxidációs állapot fokozódását. Ezekben az esetekben az összes klorofill tartalom is csökken, ráadásul a klorofill-protein komplexek arányai is megváltozhatnak. Ez okozhatja az antenna/reakciócentrum arány változását, ami szintén oka lehet a fénystressznek. Nagy sókoncentráció (Björkman et al. 1988, Lovelock & Clough 1992) és rossz vízellátás esetén (Björkman 1987, Demmig et al. 1988) is tapasztalták a fokozott energia disszipációt az antennában, jóllehet xantofill-ciklus elemzést ezekben az esetekben nem mindig végeztek. Másfelől, szőlőültetvényben súlyos aszály (Váradi, nem közölt adatok), vírusfertőzés (Váradi et al. 1997) és fitoplazma fertőzés (Váradi, nem közölt adatok) esetében egyaránt kimutatható volt a fokozott de-epoxidáció. A ciklus készletének abszolút (levélfelület egységre vetített) növekedését csak aszálystressz esetében tapasztalták. A klorofill tartalomhoz viszonyított relatív növekedés sárgulási tüneteket mutató levelekben a fokozottabb klorofill lebomlás, vagy szintézisgátlás eredménye lehet.

### **A xantofill-ciklus működésére ható belső tényezők**

A PSII fotoinaktivációja kétségtelenül természetes elhasználódás következménye a fotoszintézis normális működése során. Ennek mértéke a fényintenzitás függvénye és kivédésére – különösen a D1 protein esetében – egy gyors *de novo* fehérjeszintézis szolgál (Prásil et al. 1992, Aro et al. 1993, Chow 1994, Osmond 1994, Anderson et al.



1997, Melis 1999, Niyogi 1999). A fotoinaktiváció mérséklésére kifejlődött fényvédelmi stratégiák közé tartozik a gerjesztési energia  $\Delta\text{pH}$ -függő kioltása (Horton et al. 1996). Szintén ilyen a  $\Delta\text{pH}$  által elősegített VIO de-epoxidáció (Yamamoto 1979, Hager 1980, Demmig-Adams & Adams 1996, Horton et al. 1996, Gilmore 1997), a víz-víz ciklus, amely  $\Delta\text{pH}$ -t is generál (Asada 1999). Létezik egy PSII helyreállító ciklus, amelyben a *de novo* fehérjeszintézis a sztrómában szintén függ a pH-tól (Bhaya and Jagendorf 1984) és a sztrómabeli ATP ellátást meghatározó  $\Delta\text{pH}$ -tól (Kuroda et al. 1992). Egy újabb fotoprotektív stratégia lehetősége, nevezetesen, hogy a fotoinaktiválódott PSII hő formájában hatékonyan elvonhatja a gerjesztési energiát, megakadályozva ezzel magának a komplexnek a további károsodását, pl. az antenna pigmentek nagyobb mérvű lebomlását, már korábban felvetődött (Krause 1988). Később még az is fölvetődött, hogy a fotoinaktiválódott PSII komplexek – gerjesztési energia elnyelőként működve – segíthetnek megakadályozni a fotoinaktivációt a szomszédságukban lévő, hozzájuk kapcsolt PSII komplexekben (Öquist et al. 1992, Lee et al 2001, 2002). Tekintettel a ZEA fotoprotekcióban betöltött alapvetően fontos szerepére kell hogy legyen egy nagyon hatékony szabályozás, amely a ZEA képződését csak arra az esetre korlátozza, amikor a gerjesztő fény meghaladja a fotoszintetikus folyamatok teljesítőképességét. Feltételezik, hogy az ehhez szükséges, finom metabolikus kapcsoló szerepét a lumenben kialakuló,  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok által vezérelt lokalizált és delokalizált protonfelhalmozódás mechanizmusa játssza (Dilley 2004, Pfündel & Dilley 1994).

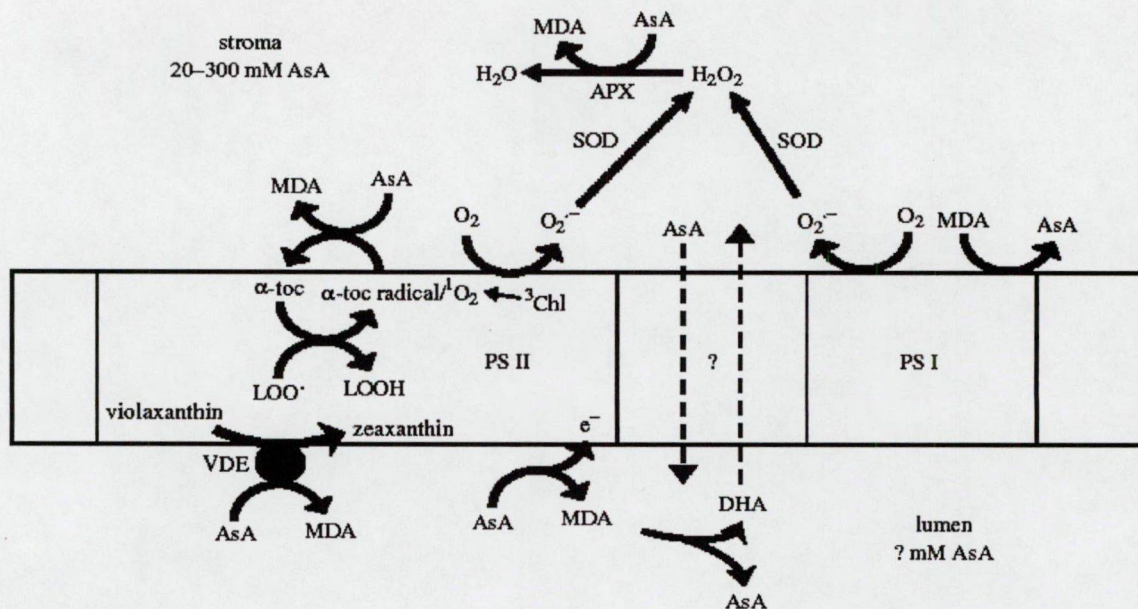
### **Az aszkorbát és lehetséges szerepe**

Az aszkorbát igen nagy (20-300 mM) koncentrációt érhet el a kloroplasztiszbán. Az intenzív fényhez történő alkalmazkodás során a levelekben és kloroplasztiszbán az aszkorbátkészlet növekedését figyelték meg és a legnagyobb értékeket a magashegyvidéki növényekben találták (HIV). Az aszkorbátnak számos funkciót tulajdonítanak a fotoszintézisben (6. ábra), köztük az oxigén fotoredukációjakor (pl. a víz-víz ciklus) és a fénylégzéskor keletkező reaktív oxigénformák befogását, az  $\alpha$ -tokoferolnak  $\alpha$ -tokoferilgyökből való regenerálását, kofaktor szerepet a VDE reakcióban és elektrondonációt a PSII-nél. A hidrogén-peroxid semlegesítését az APX katalizálja (Mehler-peroxidáz reakció). Ezt követően az aszkorbát PSI-től származó redukáló ágens által történő regenerálódása következtében létrejövő elektrontranszport többlet a  $\text{CO}_2$ -asszimilációban hasznosul. Az aszkorbát az L-galaktózon és L-galaktó-

1,4- laktonon keresztül GDP-mannózból szintetizálódik (7. ábra). Az utolsó lépés, amelyet az L-galakto-1,4-lakton dehidrogenáz katalizál, a belső mitokondriális membránon megy végbe és citokróm *c* -t használ elektronakceptorként. Ez azt sejteti, hogy létezik valamilyen koordináció az aszkorbát metabolizmus és a sejt energia metabolizmusa és redox állapota között. Jelenleg erről keveset tudunk, bár az aszkorbátkészlet negatív visszacsatolós szintézis gátlására találtak már bizonyítékot (Pallanca & Smirnoff 2000). Az L-galakto-1,4-lakton intakt levelekben aszkorbáttá történő oxidációja gyorsabb az intenzív fényhez szokott levelekben és az erős megvilágítás hatására fokozódik. Ez arra utal, hogy ez a lépés része lehet az aszkorbátkészlet fény által történő szabályozásának.

Aszkorbáthiányos (*vtc*) *Arabidopsis* mutánsok oxidatív stresszel szemben (pl.: ózon, UV-B, erős fény + sóstressz) érzékenyebbnak mutatkoztak és csökkent mértékű ZEA-függő nem-fotokémiai kioltást mutattak. Ez utóbbi eredmény egyrészt igazolja az aszkorbát kulcsszerepét a VIO de-epoxidációjában, másrészt arra utal, hogy a tilakoid lumen aszkorbát ellátása korlátozhatja ezt a reakciót (Smirnoff 2000).

A kloroplasztisz aszkorbátkoncentrációjára vonatkozóan számos mérést végeztek, amelyhez általában vizes közegben izolált kloroplasztiszokat használtak, s a kapott értékek a 10-230 mM tartományba esnek (Foyer et al. 1983; Rautenkranz et al. 1994, Streb et al. 1997). Következésképp, az aszkorbát – még ha csak a leggyakoribb, 20-50 mM koncentrációtartományt vesszük is – az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló metabolit a kloroplasztiszban, s az alpesi növényfajokban még a hihetetlenül nagy 300 mM értéket is elérheti (Streb et al. 1997). Az aszkorbátkészlet általában redukált formában van (90%), hacsak nem éri erős oxidatív stressz a kloroplasztiszokat (Law et al. 1983). A tilakoid lumenben uralkodó aszkorbátkoncentrációt pontosan nem ismerjük (Foyer & Lelandais 1996). Feltételezve, hogy a sztrómában pH=8 mellett 50mM az aszkorbát koncentrációja és, hogy disszociálatlan aszkorbinsav (az aszkorbinsav  $pK_a$  értéke 4.2) diffundál keresztül a tilakoid membránon, Eskling et al. (1997) kiszámították, hogy hordozó hiányában a tilakoid lumenben az aszkorbát koncentrációja 8mM lehet. A lumenbeli aszkorbátkoncentráció vélhetően kritikus lehet a VDE működése szempontjából (Eskling et al. 1997). Savas pH esetén a domináns disszociálatlan forma van jelen az aszkorbát anionnal szemben (Bratt et al. 1995, Eskling et al. 1997), ez is segíti a VDE működését. A számított 8mM azonban jóval kevesebb, mint a VDE esetében mért 100mM-os  $K_m$ , ezért feltételezték, hogy lennie kell tilakoidbeli



## 6. ábra

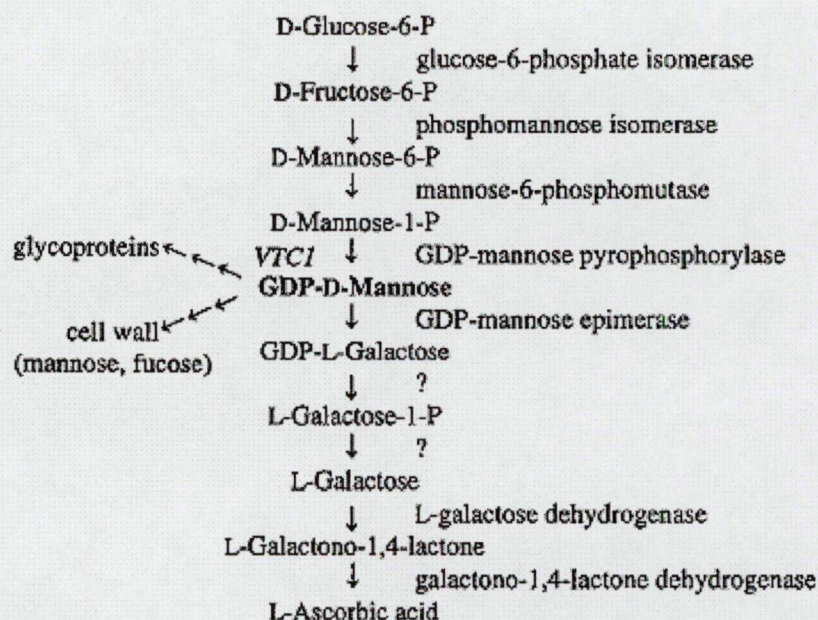
Az aszkorbát szerepe a fotoszintézisben (Smirnoff 2000). A vázolt reakciókban az aszkorbát elektrondonorként, a monodehidro-aszkorbát elektronakceptorként vesz részt, miközben kofaktora a VDE által katalizált VIO de-epoxidációnak és részt vesz reaktív oxigénformák eliminálásában. Az aszkorbát és dehidroaszkorbát tilakoid membránon keresztül történő mozgásában (szaggatott vonalak) feltételezett hordozórendszert még nem azonosították. Az aszkorbátot regeneráló reakciókat (monodehidro-aszkorbát gyökből a NADPH-függő MDA-reduktáz, dehidro-aszkorbátból pedig a glutation-függő DHA-reduktáz katalizálta reakciók) az ábrán nem tüntették fel. (AsA, aszkorbát; DHA, dehidro-aszkorbát; MDA, monodehidro-aszkorbát gyök;  $\alpha$ -toc,  $\alpha$ -tokoferol).

hordozóknak, amelyek az aszkorbátot beviszik a lumenbe és a DHA-t kiviszik a sztrómába. Másfelől, Mano et al. (1997, 2004) elgondolása szerint a kloroplasztisz aszkorbát tartalmának 10-20%-a a tilakoid lumenben található. Mivel egy tipikus kloroplasztisz esetében a lumen térfogata a teljes kloroplasztisz térfogat mintegy 20%-a (Lawlor 1993), ez azt jelentené, hogy a lumen és a sztróma ugyanakkora töménységben tartalmaz aszkorbátot. Ez azonban további méréseket igényel.

Az aszkorbát bioszintézisének utolsó lépése a mitokondriumokban zajlik és csekély bizonyíték látszik arra nézve, hogy a kloroplasztisz képes lenne aszkorbátot szintetizálni. Tehát az aszkorbátnak a citoszolból kell transzportálódnia, amely izolált kloroplasztiszon mérve 20mM-os  $K_m$ -értékű, ún. "könnyített" diffúciónak látszik (Anderson et al. 1983; Beck et al. 1983; Foyer & Lelandais 1996). A felvételi sebesség nem tud lépést tartani az aszkorbát kloroplasztiszbéli oxidációjával (Anderson et al. 1983), úgyhogy az aszkorbát megfelelő belső koncentrációját a jól ismert regeneráló



rendszerek tartják fenn (Asada 1999). A felvételi sebességnek viszont elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy kiszolgálja az aszkorbátkészlet fényintenzitás változások okozta viszonylag lassú megváltozásait.



## 7. ábra

Az aszkorbinsav feltételezett bioszintézis útja magasabbrendű növényekben (Wheeler et al. 1998). Feltüntették a *VTC1* géntermék által katalizált enzimátikus lépést, valamint a sejtfa szénhidrátok és glikoproteinek szintézise felé való leágazásokat (Conklin et al. 2000).

Az aszkorbát adagolás xantofill-ciklusra és nem-fotokémiai kioltásra gyakorolt hatása tekintetében a szakirodalomban nem egységes a kép. Az aszkorbát hiánymutánsok esetében az aszkorbát pótlása mindkét folyamatra pozitív hatású (Müller-Moulé et al. 2002), ami egyértelműen jelzi, hogy az aszkorbát potenciálisan valóban limitáló tényezője lehet a VIO de-epoxidáció és a nem-fotokémiai kioltás folyamatának. Ugyanakkor a kontroll növényekkel végzett kísérletekben többnyire csak a xantofill-ciklusra kifejtett stimuláló hatást figyelhetjük meg (Leipner 1998, Leipner et al. 2000).

## A lipidösszetétel hatása a xantofill-ciklusra és energia disszipációra

A legújabb elképzelések szerint a xantofill-ciklus a tilakoid membrán lipidfázisán belül működik, s a VIO VDE általi de-epoxidációjához lipidre van szükség, habár az optimális tilakoid lipid mibenlétét illetően eltérőek a vélemények (Yamamoto et al.

1974, Grotz et al. 1999, Latowski et al. 2002). Lipid (monogalaktozil-diacilglicerin, MGDG) szükséges a pigment-protein komplexekben helyreállított VIO de-epoxidációjához (Jahns et al. 2001, Morosinotto et al. 2002). Továbbá a VDE, amely egy lipokalin fehérje, amelyen található egy árokszerű bemélyedés, s a VDE működése szempontjából optimális feltételek esetén MGDG-t abszorbeál (Bugos et al. 1998, Hager & Holocher 1994, Rockholm & Yamamoto 1996, Yamamoto & Higashi 1978), amely a tilakoid membránok legfőbb lipid összetevője.

Feltételezik, hogy a de-epoxidációt megelőzi a VIO lipidfázisból történő fény indukálta felszabadulása, amelyet VIO hozzáférhetőségként definiáltak (Siefermann & Yamamoto 1974a). Újabb eredmények (Morosinotto et al. 2002) alátámasztják ezt annyiban, hogy a xantofill-ciklusnak valóban része a VIO pigment-protein komplexekhez való kötődése és felszabadulása. Miután kimutatták, hogy a tisztított VDE *in vitro* csak MGDG jelenlétében aktív (Yamamoto & Higashi 1978), feltételezték, hogy a klorofill antennák és az MGDG készlet között gyorsan kialakuló fényfüggő egyensúlynak szerepe lehet az *in vivo* de-epoxidációs folyamatban (Rockholm & Yamamoto 1996).

Legújabb hipotézis szerint a tilakoid membránok lipid fázisa a xantofillek részére korlátozott és így, a VIO felszabadítása és a ZEA pigment-kötő proteinek általi megkötése révén modulálja a xantofill-ciklus aktivitását (Hieber et al. 2004). Azt már korábban kimutatták, hogy az MGDG és a VIO koncentrációk aránya kritikus és 28:1 arány optimális, amelynél kisebb érték esetén a de-epoxidáció lassú és nem teljes (Yamamoto et al. 1974). Az optimális mólaránynál a legnagyobb a de-epoxidáció sebessége és a de-epoxidáció teljes. Az optimumon túl viszont megint csökken a de-epoxidáció sebessége, de a teljes de-epoxidáció lezajlik. Más tilakoid lipidek, mint például a második leggyakoribb DGDG (digalaktozil-diacilglicerin) – függetlenül a lipid-pigment mólaránytól – nem teszi lehetővé a VIO teljes de-epoxidációját. Tekintve, hogy a VIO VDE-hez jutása a pigmentkötő proteinből való felszabadulást követően egy diffúziós folyamat, feltételezhetjük, hogy a zsírsav oldalláncok telítetlenségének szerepe lehet a de-epoxidáció sebességének és fokának meghatározásában. Modell lipid kettősrétegek alkalmazásával arra a következtetésre jutottak, hogy a membrán fluiditása befolyásolhatja a VIO VDE által történő de-epoxidációját (Latowski et al. 2002). Ugyanakkor érdekesek azok a megfigyelések, amelyek arról számolnak be, hogy a ZEA akumulálódása a tilakoid membránban fokozza annak rigiditását (Gruszczycki & Strzalka 1991, Strzalka & Gruszczycki 1997, Tardy & Havaux 1997).



#### **1.2.4.2. A xantofill-ciklus függő nem-fotokémiai kioltás mechanizmusa**

Ebben a fejezetben azokra a kérdésekre keresem a választ, hogy közvetlenül részt vesznek-e karotinoidok, nevezetesen a ZEA a fluoreszcencia kioltási folyamatban, az energiatúlterhelés disszipációjában, milyen módon vesz részt a ZEA vagy más karotinoid a fotoszintetikus fénybegyűjtés szabályozásában.

A nem-fotokémiai kioltás (NPQ) a jelenségét évek óta dokumentálják, azonban fizikai mechanizmusának alapvető megértése még várat magára. Legfőbb komponense a gyorsan lecsengő, reverzibilis energiatúlterhelés kioltás (qE) 535nm-nél megfigyelhető abszorpcióváltozással jellemezhető (Gilmore 1997) és megrövidíti a klorofill fluoreszcencia bizonyos komponenseinek életidejét (Gilmore et al. 1995). Ennek feltétele egy fény indukálta pH-gradiens ( $\Delta pH$ ) kialakulása (Horton et al. 1996, Müller et al. 2001), ez viszont elindítja a VIO  $\rightarrow$  ZEA átalakulást is a xantofill-ciklusban. Jelenleg két fő hipotézis létezik a qE mechanizmusát illetően. Egyikben a ZEA hatását teljesen strukturális jellegűnek tekintik (ún. indirekt kioltás), a másikban a ZEA energia akceptorként működik, miközben az első szinglett gerjesztési állapotban lévő klorofilltól energiát vesz át (ún. direkt kioltás). Ez utóbbi mellett szól a ZEA viszonylagosan kisebb  $S_0 \rightarrow S_1$  átmeneti energiája (Frank et al. 1993) és az  $S_1$  állapotának a klorofill első szinglett gerjesztett állapotához ( $Q_{y(0-0)}$ ) képest rövid élettartama (kb. 10ps, Frank et al. 1994). Közelmúltbeli közvetlen mérések viszont azt mutatták, hogy a különböző karotinoidféleségek  $S_1$  átmeneti energiái – akár oldatban, akár fénygyűjtő komplexekhez kötve – csaknem azonosak (Polivka et al. 1999, 2002). Az újabb eredmények alátámasztják azt az elképzelést, miszerint a klorofill  $S_1$  állapotból az  $S_1$  állapotú ZEA-ra történő energiaátvitel a fülös energia disszipációjának mechanizmusa (Ma et al. 2003).

Korábbi dolgozatok nagy eltéréseket mutattak a kötött és szabad karotinoid frakció tekintetében, s úgy tartották, hogy a xantofillek túlnyomó része (80%) pigment-protein komplexekben megkötve fordul elő (Bassi et al. 1993, Yamamoto & Bassi 1996). Később különlegesen kíméletes frakcionálási módszereket alkalmazva (Ruban et al. 1999) arra következtetésre jutottak, hogy a PSII-ben az összes *in vivo* de-epoxidálódó VIO az LHCII trimerekhez lazán kötött VIO-nak felel meg. Ez azt jelenti, hogy csak csekély mennyiségben van, vagy egyáltalán nincsen szabad VIO a tilakoid membránban. A ZEA tekintetében teljesen bizonytalan, hogy *in vivo* mekkora része található szabadon a membrán lipidfázisában. A vizsgáló módszerek további

finomodásával érdekes részleteket tudtak meg a xantofilok tilakoidbeli kötődési dinamikájáról (Morosinotto et al. 2003). A magasabbrendű növények fotoszintetikus pigment összetétele extrém mértékben konzervált: a kloroplasztisban kódolt reakciócentrum komplexek  $\beta$ -karotint és klorofill  $a$ -t kötnek meg, míg a sejtmagban kódolt fénygyűjtő proteinek a klorofill  $a$  és klorofill  $b$  mellett háromféle xantofillt, luteint, VIO-t és neoxantint kötnek meg. A fénygyűjtő polipeptidek szekvenciája úgyszintén erősen konzervált (Jansson 1999), azonban az Lhc család minden egyes tagjának egyedi karotinoid összetétele van.

Azon túlmenően, hogy a VIO de-epoxidációját végző lumenben lokalizált VDE enzim savas pH esetén aktiválódik, az enzimnek valamilyen módon kapcsolódnia kell a tilakoid membránhoz, hiszen szubsztrátja a tilakoid lipidfázisában oldva található. A VDE a pH-tól függően kötődik a membránhoz, a pH emelkedésekor 6.6-os értéknél egy viszonylag szűk pH sávban szabaddá válik (Bratt et al. 1995). Ez azt jelenti, hogy a VDE membránhoz kötődése savas környezetben nem limitálhatja a reakció sebességét. A következő lépés a VIO szabaddá válása, hiszen az Lhc proteinekhez kötött VIO nem vehet részt a VDE katalizálta de-epoxidációs folyamatban (Yamamoto & Bassi 1996). A *chlorina f2* árpa mutánsokkal – amelyekben a VIO szabadon van a membrán lipidfázisában – végzett de-epoxidációs kísérletekben ezt alátámasztva igazolták, hogy a limitáló lépés a VIO-nak az Lhc komplexekből való felszabadulása, semmint a VDE aktiválódása. A VDE feltételezés szerint a tilakoid lipidmembránhoz kötődve bemélyedésszerű aktív centrumában katalizálja a VIO és az ANT de-epoxidációját, amelyhez azoknak minden egyes ciklusban oda kell diffundálniuk (Hieber et al. 2004). A lipocalin bemélyedést keskenynek, egyenesnek és a xantofill molekulával megegyező hosszúságúnak feltételezik, amelynek a legmélyebb pontján lehet az aktív hely, mivel *cisz* pigmenteket nem képes de-epoxidálni (Yamamoto & Higashi 1978, Grotz et al. 1999).

A VDE közreműködésével keletkező ZEA kettős lokalizálódást mutat: egyik része szabadon marad a membránban, másik része Lhc komplexekhez kötődik. A szabad részről feltételezik, hogy hatékonyan részt vesz a lipid peroxidáció elleni védelemben (Havaux & Niyogi 1999). Az LHCII komplexek esetében a V1 kötőhely játszhat szerepet a hozzáférhető VIO biztosításában (Morosinotto et al. 2002). A monomer antenna komplexek – különösen a CP26 és CP24 – jóval nagyobb ZEA kötési sebességet mutattak az *in vitro* mérésekben. Az értelmezés szerint ezek a proteinek lehetnek a kezdeti fénygátlás szakaszában a ZEA által modulált fotoprotekciós

mechanizmus résztvevői, míg egy elhúzódó fénystressz esetében a lassabban reagáló CP29 energia disszipációban betöltött szerepe is fokozódik. Az *in vivo* és *in vitro* rendszerben kapott eredmények jó összhangban állnak egymással (Morosinotto et al. 2002), jelezve, hogy a xantofill kicserélődési tulajdonság egy adott géntermék egyedi tulajdonsága, s a fehérjék sztérikus gátlása a tilakoid membránokban – ha jelentkezik is – csekély mértékű lehet.

A ZEA képződés azonban csak szükséges, de nem elégséges feltétele a qE kialakulásának (Niyogi 1999). A  $\Delta pH$  mellett egy specifikus pigmentkötő proteint, a PsbS-t (CP22) esszenciálisnak találták a qE kialakulásában (Li et al. 2000 a,c). Az egyik legfrissebb modell szerint (Morosinotto et al. 2003) a stresszhelyzet érzékelésében a lumen pH-jának csökkenése a kulcsfontosságú jel. A savas pH aktiválja a PsbS proteint és bekapcsolja a ZEA képződést is. A ZEA nem nélkülözhetetlen az NPQ-hoz, hanem annak csak amplitúdóját növeli. Még a xantofill-ciklus aktiválódását megelőzően megfigyelhető egy gyors válasz, amely a fölösleges energia gyors kioltását eredményezi. A PsbS részese ennek a gyors válasznak, feltehetően a lumen oldali savas aminosavmaradékok protonálódásának köszönhetően. A PsbS működésének pontos mechanizmusát még fel kell deríteni. Különösen az nem világos, hogy hatása függ-e más klorofillkötő antenna fehérjékkel való kölcsönhatásoktól. A kioltás lassú fázisa inkább ZEA-függő, amelyben az újonnan képződő ZEA kezdetben szabadon létezik a membránon belüli lipidszféra környezetében és jelátvivőként szolgálhat a különböző fotoprotektív mechanizmusok felerősítéséhez. Úgy tűnik, hogy a ZEA egyidejűleg hat a fénygyűjtő protein konformációra és a PsbS-re. A fénygyűjtő antenna komplexekhez való kötődése csökkenti azok fluoreszcencia hatásfokát, amelyből a fénygyűjtő funkció visszafogására következtetnek (Formaggio et al. 2001, Moya et al. 2001), amely elősegíti egy további kioltási effektus létrejöttét. Azonfelül a ZEA-ról feltételezik, hogy *in vitro* (Aspinall-O'Dea et al. 2002) és nagyfokú kioltás esetén *in vivo* (Ruban et al. 2002) is kötődik a PsbS-hez. Ez a bekötődés egy hosszantartó kioltást indukálhat, amely a fotoszintetikus apparátus évszakos stressz rezisztenciáját okozhatja az áttelelő örökzöldek esetében (Gilmore & Björkman 1994, Matsubara et al. 2002).

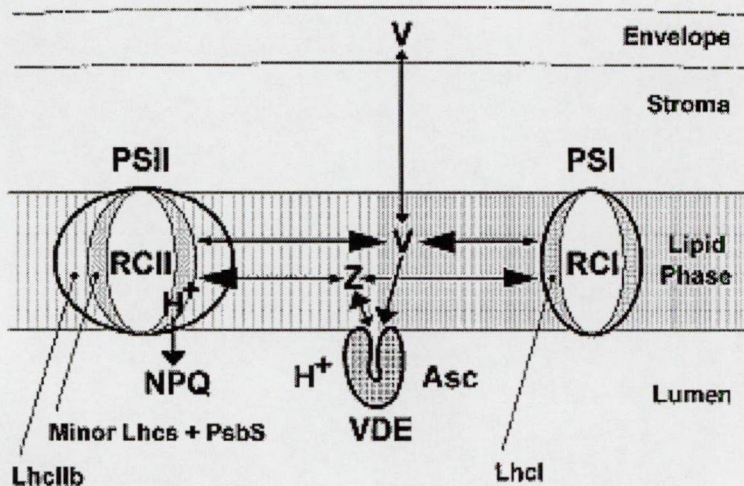
PsbS és a PsbS+VDE túltermelést mutató dohány mutánsokban az NPQ megduplázódását figyelhették meg, a PsbS proteint túltermelő *Arabidopsis* mutánsokhoz teljesen hasonlóan (Li et al. 2002c). Amint azt már korábban kimutatták, az MGDG és a VIO aránya kritikus a de-epoxidációs folyamat szempontjából és a 28:1 MGDG/VIO mólarányt találták optimálisnak (Yamamoto et al. 1974). A PsbS túltermelődés az

MGDG-hez hasonló hatású volt, feltehetően a PsbS protein a ZEA megkötése révén, amely a ZEA-t a lipidfázisból fokozottan kivonva képes megakadályozni vagy csökkenteni a ZEA negatív (termék-) visszacsatolások szabályozáson alapuló, de-epoxidációt gátló hatását (Hieber et al. 2004).

A ZEA abszorpciós spektrumában a PsbS proteinhez történő kötődéskor feltételezett vörös eltolódásnak tulajdonítják az NPQ (még inkább a qE) kialakulásával mindig együtt jelentkező  $\Delta A_{535}$  abszorpcióváltozást (Bilger & Björkman 1994, Li et al. 2000).

Legújabban PsbS mutánsok segítségével kísérletesen igazolták, hogy a PsbS protein lumen felőli hurokszakaszainak savas aminosavmaradékai valóban kulcsfontosságúak a qE kialakulásában (Li et al. 2004).

A fotooxidatív károsodással szembeni ellenállóképesség mechanizmusára vonatkozó adatok arra utalnak, hogy – habár egyetlen ilyen mechanizmus sem válik teljesen inaktívvá ZEA távollétében – a ZEA növeli a fotoprotektív válaszok amplitúdóját. Krónikus stresszhelyzetben tartós fluoreszcencia kioltás állapota áll elő a ZEA felhalmozódás



## 8. ábra

A tilakoidok lipidmátrixában működő xantofill-ciklus modellje (Hieber et al. 2004). Az egyszerűség kedvéért az ANT és a ZEA VIO-ná történő epoxidációja nincs feltüntetve.

következtében. A ZEA képződés módja, ZEA felszabadulása a membrán lipidfázisában, a fotoszintetikus apparátus egyes komponenseihez történő diffúziója és aktivitásuk modulációja mind arra utal, hogy a xantofill-ciklus valójában egy jelátviteli rendszer, amelyben a fény által generált lumen savanyodás képviseli a jelet, a VIO LHC-



trimerekből való felszabadulása játssza az elsődleges hírvivő szerepét, míg a lumen savas pH-ja által aktivált VDE a jelátalakító. A ZEA a másodlagos hírvivő, a lipidfázis az átviteli hálózat és a ZEA-kötő proteinek pedig a célobjektumok (8. ábra). A ZEA valójában "allosztérikus hatásfokozó"-ként működik, amely felerősíti és stabilizálja azon fotoprotektív mechanizmusokat, amelyek már a ZEA távollétében bekapcsolódtak.

#### **1.2.5. A PSII helyreállítása mint fotoprotektív mechanizmus**

A növények életük során változatos stresszhatásoknak vannak kitéve, amelyek a nagyon gyors (másodperces) változásoktól a szezonális tendenciákig széles időskálán jelentkeznek. Nem meglepő tehát, hogy többféle – sokszor konkurens – molekuláris mechanizmus alakult ki a fotoprotekció céljára. Ezt bizonyítja az is, hogy még a legdrasztikusabb NPQ hiánymutációk (*npq1* és *npq4*) (Li et al. 2000, 2001 a,b,c) esetén is megmarad az NPQ egy kis működő része. A fotoszintetikus apparátus károsodása – a többszörös védelmi vonal ellenére – az oxigénes fotoszintézis szükségszerű következménye. Az oxigénes fotoszintézist folytató szervezetekben kialakult egy bonyolult, ám hatékony rendszer a PSII reakciócentrumok kijavítására, amely magába foglalja a károsult proteinek (elsősorban a D1) szelektív lebontását és az újonnan szintetizált fehérje beépítését, újra létrehozva a működőképes PSII-t (Aro et al. 1993). Bizonyos körülmények között a károsodott PSII reakciócentrumok a hődisszipáció (fénygátláskor kialakuló nem-fotokémiai kioltás lassan lecsengő qI komponense) helyszínei is lehetnek (Krause 1988, Öquist et al. 1992). A PSII helyreállítása fontos fotoprotektív mechanizmus, mert a kijavítás sebességének és a károsodás sebességének meg kell egyeznie, hogy a működő PSII centrumok nettó csökkenéséből fakadó fénygátlás elkerülhető legyen. Ezért a kloroplasztiszban kódolt fehérjék – különösen a D1 – folytonos újra szintetizálódása a fotoprotekció szempontjából minden fényintenzitáson kritikus. A kloroplasztiszban folyó fehérjeszintézis (inhibitorokkal történő) gátlása esetén fénygátlást és a D1 protein nettó veszteségét figyelték meg (lásd pl.: Baroli & Melis 1996, Tyystjärvi & Aro 1996).

Miután kimutatták, hogy a fitoén-deszaturáz magasabbrendű növényekben plasztokinon-függő (Mayer et al. 1990, Norris et al. 1995), feltételezhető, hogy a plasztokinon redox állapota korlátozhatja a karotin bioszintézist, amely korlátozza a PSII helyreállítását (összeszerelését), s ez egyensúlyban tarja a plasztokinon redox állapotát. Ily módon a PSII mennyisége – a D1 protein gyors turnover-én és a  $\beta$ -

karotinnak a D1 összeállításában betöltött szerepén keresztül – a fényviszonyokhoz igazodhat (Trebst & Depka 1997).

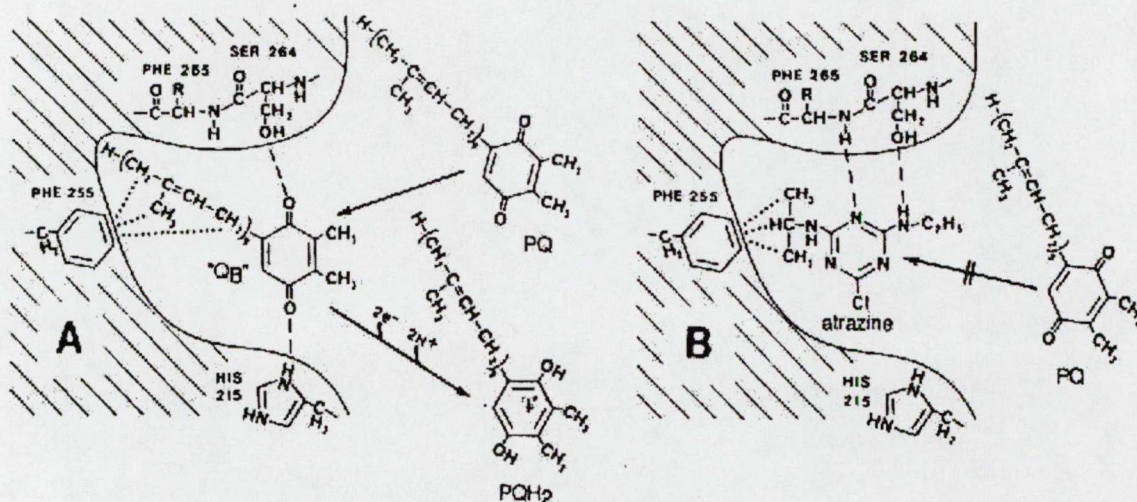
### **1.3. Az atrazin-rezisztencia mechanizmusa és kísérő jelenségei**

Tekintve, hogy dolgozatomban egyik fő témaköre az atrazin-rezisztens (AR) gyom biotípusok esetében általánosan tapasztalható megnövekedett fényérzékenység és a xantofill-ciklus megváltozott működése, indokolt, hogy röviden áttekintsük az atrazin rezisztenciával kapcsolatos eddigi ismereteket.

Az első herbicid-rezisztens gyom biotípussal, a simazinnal szemben rezisztens *Senecio vulgaris* populációval 1968-ban találkoztak (Ryan 1970). Egy 1989-ben lezárt felmérés szerint világszerte már 57 gyomfajnak (40 kétszikű, 17 egyszikű) találták meg triazin-rezisztens biotípusát (LeBaron 1991). Becslések szerint akkoriban mintegy 3 millió hektár termőterület volt triazin-rezisztens gyomokkal fertőzött, amelynek nagy része az USA, Kanada és Európa területére esett, ahol jelentős kukorica monokultúrákban éveken keresztül ismétlődően alkalmazták a triazinokat. Jelenleg 65 gyomfaj (44 kétszikű, 21 egyszikű) triazin-rezisztens biotípusát tartják nyilván. A PSII-gátló herbicidekkel szembeni rezisztencia kevés kivétellel a herbicid molekula hatóhelyének (D1 protein), kötődési helyének módosulásán alapul (9. ábra). A gyomnövényekben általánosan előforduló atrazin-rezisztencia a PSII reakciócentrum 32 kDa móltömegű D1 proteinjét kódoló *psbA* kloroplasztisz gén pontmutációjának tudható be, melynek következtében a D1 protein láncának 264-es pozíciójában szerin helyett glicin jelenik meg (Hirschberg & McIntosh 1983, Gressel 1985). Ez az aminosav csere éppen a triazin típusú herbicidek kötőhelyének régióját érinti (9. ábra). Hatására drasztikusan csökken az említett herbicidek kötőhelyhez való affinitása, ami a rezisztencia okának tekinthető. Ez a régió azonban a Q<sub>B</sub> plasztokinon kötőhelye is (Pfister, & Arntzen 1979). Ezért az aminosav csere nem csak a herbicid molekula, hanem a Q<sub>B</sub> kinon affinitását is rontja, miáltal lelassul a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> közötti elektronátadás sebessége (10. ábra).

Az atrazin-rezisztenciát kísérő számos ún. pleiotrop hatás között a lassúbb fotoszintetikus elektrontranszport rátát, a PSII-höz kötődő fotokémiai folyamat kisebb hatékonyságát és az AR növények gyengébb produktivitását is általánosan megfigyelték (Holt et al. 1981, Ort et al. 1983, Ireland et al. 1988). Számos szerző azt tartja, hogy a tilakoid membránok lipid és zsírsav összetételében megfigyelhető különbségek okozhatják az AR biotípusok magas hőmérsékletekkel szembeni kisebb toleranciáját

(Ducruet & Lemoine 1985, Havaux 1989), amely szintén magyarázhatja az általánosan megfigyelt gyengébb produktivitást.



## 9. ábra

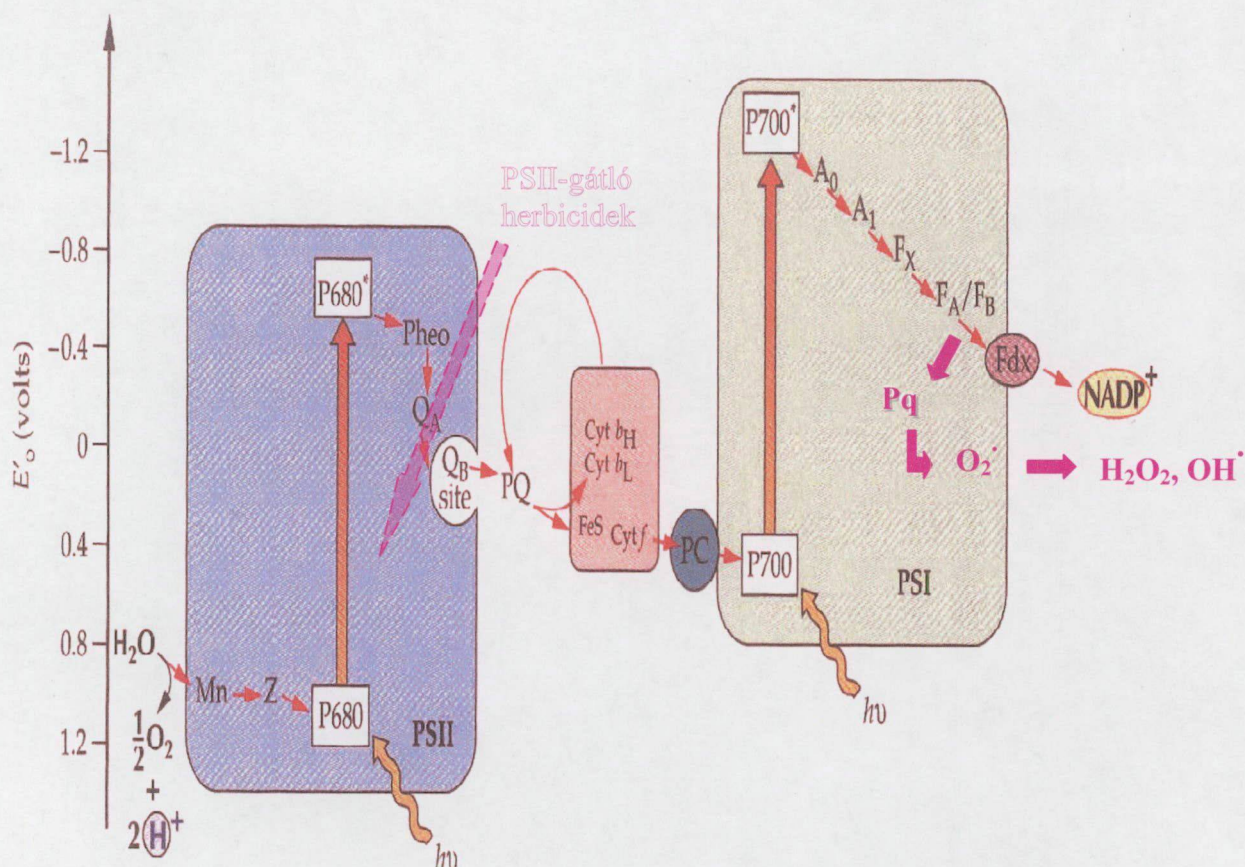
A Q<sub>B</sub> plasztokinon (A) és az atrazin (B) kölcsönhatásának sémája a D1 protein Q<sub>B</sub> kötőhelyén (Fuerst & Norman 1991). A hidrogénhidas kötések és a hidrofób kölcsönhatást rendre szaggatott ill. pontozott vonalak jelzik. Az atrazin bekötődése megakadályozza a plasztokinon kötődését. A Ser<sub>264</sub>→Gly csere esetén a csökkent mérvű hidrogénhidas kötés következtében romlik az atrazin (és a plasztokinon) kötőhelyhez való affinitása

Az AR biotípusok nagyobb fényérzékenységről és a fényátlással szembeni nagyobb érzékenységről egyaránt beszámoltak (Holt et al. 1981, Hart & Stemler 1990). Egyik elképzelés szerint (Sundby et al. 1992, 1993) a D1 protein mutációja egyrészt közvetlenül hat a PSII működésére, amely viszont fokozott fényátlást és nagyobb sebességű degradációs/helyreállítási folyamatot (turnover) eredményez. Mind a fény limitált fotokémiai hatékonyság, mind a fényátlással szembeni fokozott érzékenység valószínű oka lehet egy csökkent növekedésnek az AR növények

Miután a D1 protein kloroplasztiszban kódolt fehérje, az atrazin-rezisztencia anyai ágon öröklődik (Souza Machado et al. 1978). Számos gyomfaj AR és AS biotípusának fotoszintézisét és produktivitását megvizsgálták és az *Amaranthus* spp. (Ort et al. 1983, van Oorschot & Leeuwen 1984), a *Brassica* spp. (Hobbs 1987) és a *Senecio vulgaris* (Holt et al. 1981, Holt et al. 1983, Ireland et al. 1988) AR biotípusa esetében csökkent mértékű fotoszintetikus CO<sub>2</sub> asszimilációs rátáról számoltak be. A lassúbb PSII elektrontranszport és a kisebb kvantumhasznosítási hatások ugyancsak jellemző az AR biotípusokra (Bowes et al. 1980, Holt et al. 1981, Jursinic & Percy 1988, Ort et al. 1983, Holt et al. 1983, Ireland et al. 1988, Burke et al. 1982, De Prado et al. 1992).



Számos gyomfaj AR biotípusa árnyékos nevelési környezetnek megfelelő levél anatómiai jelleget és kloroplasztisz ultrastruktúrát mutat, beleértve a nagyobb mérvű gránumosodást. A fotoszintetikus apparátus szerkezete is változik: a csökkent klorofill *a/b* arányt és a fénygyűjtő klorofill-protein komplexek nagyobb mennyiségét írták le ([Burke et al. 1982](#), [Holt & Goffner 1985](#), [Lemoine et al. 1986](#)).  
esetében.



## 10. ábra

A PSII-gátló herbicidek és a paraquat hatásmechanizmusának sematikus bemutatása.

Mindezek alapján nem tűnik meglepőnek az AR növények gyengébb produktivitása és populációban atrazin hiányában az AS (vad) biotípussal szembeni gyengébb kompetitív képessége ([Holt & Thill 1994](#)). Számos közleményben leírták például a *Chenopodium album* ([Elliott & Peirson 1983](#)), a *Senecio vulgaris* ([Holt 1988](#), [Holt & Radosevich 1983](#), [Warwick 1980](#)) és a *Solanum nigrum* ([Zanin & Lucchin 1990](#)) AR biotípusának kisebb biomassza és mag produkcióját, vagy az *Amaranthus powellii* ([Weaver & Warwick 1982](#)), az *A. retroflexus* ([Weaver & Warwick 1982](#), [Conard & Radosevich](#)



1979), a *C. album* (Warwick & Black 1981) és a *S. vulgaris* (Holt 1988, Conard & Radosevich 1979) AR biotípusának gyengébb kompetíciós képességét.

A betyárkóró (*Erigeron* vagy *Conyza canadensis*) Magyarországon talált AR és AS biotípusaiban a Hill-reakció sebessége eltérő hőmérséklet érzékenységet mutat, amit a fluoreszcencia indukciós mérések is igazoltak. (Pölös et al. 1987). Eltérő hőmérsékletekhez (5 és 25°C) akklimatizálódott AS és AR betyárkóró növények fluoreszcencia indukciós paramétereinek hőmérséklet függését tanulmányozva megfigyelték, hogy az AR biotípusban gyakorlatilag nem jelentkeztek a hőmérséklet akklimatizáció AS biotípusban jól kimutatható jelei (Dulai et al. 1998, 1999). Hasonlóképpen, az AS növényekben megfigyelték a CO<sub>2</sub> asszimiláció optimális hőmérséklet tartományának a nevelési hőmérséklet hatására történő eltolódását, míg az AR biotípusban ez alig volt kimutatható.

Miután a D1 protein és a PSII reakciócentrum a kapcsolódó antenna pigment-protein komplexekkel együtt a tilakoid membránok lipid mátrixába ágyazva működik, az eltérő hőmérséklet érzékenységgel kapcsolatos jelenségek jól értelmezhetőek a biotípusok lipid- és zsírsav összetételében megfigyelt jellegzetes eltérésekkel (Lehoczki et al. 1985). Nevezetesen, az AR biotípus tilakoid membránjaiban kevesebb poláros lipidet találtak. Az AR növény kloroplasztiszai több MGDG-t, viszont kevesebb DGDG-t és foszfatidil-gliceridet tartalmaznak az AS növényekéhez képest. A kloroplasztiszok összes lipidje az AR biotípus esetében nagyobb mérvű telítetlenséget mutat, amely a glikolipid frakció nagyobb linolénsav és kisebb palmitinsav tartalmának köszönhető. A foszfolipidek zsírsav összetétele a foszfatidil-glicerid kivételével nem különbözött. Az AR növények tilakoid membránjainak lipid mátrixa a fluoreszcencia polarizációs mérések tanúsága szerint nagyobb fluiditást mutat az AS növényekéhez viszonyítva (Lehoczki et al. 1985).

A szakirodalom azonban nem teljesen egységes az AR biotípus gyengébb bioprodukcióját illetően. Számos esetet leírtak, amelyben az AR és AS biotípusok hasonló fotoszintetikus teljesítményt és produktivitást mutattak, vagy ahol az AR biotípus túlszárnyalta az AS párját (van Oorschot & Leeuwen 1984, Jansen et al. 1986, Schonfeld et al. 1987). Ráadásul, az *A. powellii* és az *A. retroflexus* (Weaver et al. 1982), valamint a *C. album* (Warwick & Marriage 1982a, Warwick & Marriage 1982b) összehasonlító vizsgálataiban kimutatták, hogy a különböző helyekről származó populációk között gyakran nagyobb variabilitás tapasztalható, mint az AR és AS populációk eltérése. Miután az atrazin-rezisztencia a kloroplasztisz genomon kódolt,



még az ugyanazon helyen gyűjtött AR és AS növények is valószínűleg különböznek egyes sejtmagban kódolt olyan tulajdonságokban, amelyek bizonyos mértékig kompenzálhatják az atrazin-rezisztencia okozta hátrányos tulajdonságokat (McCloskey & Holt 1990). Izonukleáris biotípusokkal – amelyek kizárólag az atrazin-rezisztencia tulajdonságában különböznek – végzett kutatások eredményei viszont igazolták, hogy a megváltozott kloroplasztisz működés az AR biotípusban az egész növény szintjén korlátozza a fotoszintézist, növekedést és produktivitást (Jursinic & Pearcy 1988, McCloskey & Holt 1990, Beversdorf et al. 1988, Darmency & Pernes 1989, Gressel & Ben-Sinai 1985, Stowe & Holt 1988, van Oorschot & Leeuwen 1989).

#### **1.4. Az *Erigeron canadensis* paraquat-rezisztenciája és feltételezett mechanizmusa**

Dolgozatom másik nagy területe a paraquat rezisztencia mechanizmusával kapcsolatos, ezért célszerűnek tartom az erre vonatkozó szakirodalom áttekintését.

A paraquat (metilviologén, 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium, a Gramoxone<sup>®</sup> nevű nem szelektív, kontakt gyomirtószer hatóanyaga) (Pq) erős elektronakceptorként a PSI-től vesz föl elektront (10. ábra), miáltal egy rövid élettartamú, reaktív kation-gyök keletkezik, amely szuperoxid-gyökké redukálhatja a molekuláris oxigént. A keletkező szuperoxid-gyököt az 1.3.3. fejezetben leírtak szerint a fotoszintetikus apparátus antioxidáns védelmi rendszere hatástalaníthatja, ámde a Pq hatására általában olyan mértékben termelődik ez a reaktív oxigénforma (és a belőle láncreakció szerűen keletkező, szintén reaktív további szabad gyökök), hogy a normál életkörülményekhez akklimatizálódott védelmi rendszer azt nem képes feldolgozni. Ezáltal beindul egy rohamos lipid-peroxidáció és egy általános membránkárosodás, amely a zöld növényi szövetek gyors pusztulásához vezet. A Pq az alkalmazott koncentrációban fényen – feltehetően a szövetek és transzport mechanizmusok igen gyors károsodása miatt – észrevehetően nem transzlokálódik a kezelt növényben, így a rezisztencia hátterében valamilyen gyors reagálású és nagy hatékonyságú mechanizmust kell feltételeznünk.

Az első paraquat-rezisztens gyom biotípusok az 1980-as évek derekán tűntek föl, s Magyarországon elsőként atrazin-rezisztenciával is rendelkező betyárkóró populációban (PqAR biotípus) figyelték meg ezt a tulajdonságot (Pölös et al. 1987). A kétféle hatóanyaggal szembeni ún. ko-rezisztencia azonban semmilyen összefüggést nem mutat. A később megtalált hazai csak paraquat-rezisztens (PqR) betyárkóró tölevélrózsás fejlődési stádiumban 180-szor, míg a különböző helyekről származó

PqAR biotípusok 210-től 650-szer töményebb Pq alkalmazása esetén mutattak 50%-os pusztulást a vad (szenzitív, PqS) biotípushoz képest (ún. rezisztenciafaktor, Rf). Virágzási szakaszban akár 1000-szeres rezisztenciát is megfigyeltek (Turcsányi et al. 1998). A megegyező hatásmechanizmusú, de eltérő redoxpotenciálú diquat hatóanyag esetén a PqR és PqAR biotípusra rendre 47- és 50-110-szeres rezisztenciát mértek (Szigeti et al. 1994). A Magyarországon azonosított paraquat-rezisztens betyárkóró biotípusok egyik jellemző, és fontos tulajdonsága az extrém magas Rf érték.

Az eltelt, immár két évtized ellenére a paraquat-rezisztencia mechanizmusára vonatkozóan több, egymással gyakran ellentétes elméletet valló iskola létezik. A legjelentősebb Pq-rezisztencia hipotézisek a következők:

- A Pq bejutása a levélbe ill. a kloroplasztiszba gátolt, vagy nagyon lelassult.
- Felfokozott aktivitású antioxidáns védőenzim rendszer.
- A Pq metabolikus hatástalanítása.
- A Pq szekvesztrálódása, konjugációja.

A részletek ismertetése nélkül megállapítható, hogy a paraquat-rezisztencia mechanizmus megismerésében nagyon lassú az előrehaladás. Soós et al. (2004) legújabb eredményei a paraquat szekvesztrálódásával hozzák kapcsolatba a paraquat-rezisztencia mechanizmusát. Véleményünk szerint valószínű, hogy a fent említett mechanizmusok egyes elemeinek kombinálódásával jön létre a rezisztencia, nevezetesen lehet, hogy van egy kissé gátolt bejutás a kloroplasztiszba, majd egy felfokozott antioxidáns enzimrendszer átmenetileg megvédi a membránrendszert a destrukciótól, miközben indukálódnak azok a molekulák, amelyek konjugátumot képezhetnek a Pq-tal, és/vagy transzporterként résztvehetnek a szekvesztrációs folyamatban, ezáltal hatástalanná teszik és/vagy eltávolítják a hatóhelyéről a Pq-ot. Részletesen tanulmányozták az antioxidáns enzimek (SOD, APX, GR, CAT) szerepét is a betyárkóró paraquat rezisztenciájában, és arra a következtetésre jutottak, hogy az oxigéngyököket detoxifikáló enzimek kloroplasztiszban vagy citoszolban mérhető endogén vagy indukálható aktivitása nincs összefüggésben a magas paraquat-rezisztencia értékekkel (Turcsányi et al. 1998).

Jelen dolgozatnak nem volt célja a paraquat-rezisztencia teljes mechanizmusának felderítése, hanem csak ennek egy fontos részletére, egyes fotoprotektív mechanizmusokkal kapcsolatos kísérőjelenségek megismerésére törekedtem. Az általam vizsgált paraquat-rezisztens betyárkóró biotípusok legalapvetőbb jellegzetessége, hogy



a fotoszintézissel kapcsolatos különböző funkciók (széndioxid asszimiláció, fotoszintetikus oxigén termelés, fluoreszcencia indukciós paraméterek) a paraquat kezelést követően átmeneti gátlást, majd fokozatos helyreállást mutatnak.

## 1.5. Előzmények

A 80-as évek végén, s a 90-es évek elején kutatásaink elsősorban a paraquat-rezisztencia mechanizmusának felderítésére irányultak (384. sz. OTKA kutatási program, 1989-1994). Fontos megfigyeléseket tettünk arra, hogy a fény nem csak a paraquat elsődleges hatásmechanizmusában, hanem a vele szembeni rezisztencia mechanizmus működésében is alapvető fontosságú lehet (Váradi et al. 1990, Lehoczki et al. 1992). Ezt megelőzően és ezzel egy időben, a 80-as évek második felében megerősödött a xantofill-ciklus fotoprotektív szerepét hangsúlyozó iskola (Demmig et al. 1987b), ezáltal felvetődött annak lehetősége, hogy a xantofill-ciklus, fényfüggő folyamat lévén szerepet játszhat a paraquat-rezisztencia mechanizmusában is. 1990-ben a levélben található karotinoidok elválasztására és mennyiségi mérésére olyan HPLC-módszert állítottam be (Britton 1988-ban személyes közlés útján átadott módszerének további finomításaként: Váradi et al. 1992), amellyel lehetővé vált a levelek vizes-acetonos nyers extraktumából a xantofill-ciklus mindhárom komponensének gyors és megbízható meghatározása. A betyárkóró paraquat-szenzitív (PqS) és paraquat/AR (PqAR) növényeken végzett laboratóriumi összehasonlító vizsgálatok alapján megállapíthattuk, hogy Pq jelenlétében a PqS növények egyértelműen extrém violaxantin (VIO) de-epoxidációt mutattak, míg a PqAR növények leveleiben a kezdeti erőteljesebb effektust követően egy visszafogottabb de-epoxidációt tapasztaltunk 24 vagy 48 óra elteltével, amely azonban a jelentős szórás miatt nem tűnt egyértelműnek, ezért akkor ezt hibás kísérletnek ítéltük. Lényeges és konzekvens eltérést találtunk viszont a PqS és PqAR biotípusok ún. fénykontrolljai esetében, azaz a biotípusokban működő xantofill-ciklus fényválaszában: nevezetesen, a rezisztens növény esetében a szenzitívhez képest egy kisebb mérvű fényválaszt, vagyis egy visszafogottabb fény indukálta zeaxantin (ZEA) képződést figyelhettünk meg. Akkori ismereteink birtokában ezt a jelenséget a paraquat-rezisztenciához kötöttük (Váradi & Pölös 1992), nem vizsgálva egyéb herbicid-rezisztencia esetleges szerepét. Fontos megjegyeznünk, hogy 1992-ig Magyarországon, különböző termőhelyeken csak a betyárkóró PqAR biotípusát tudtuk azonosítani. Ebben az időszakban végeztünk olyan terepmunkát, amelynek során az ország különböző vidékein gyűjtöttünk különböző eredetű paraquat-rezisztens betyárkóró biotípusokat. Ezek között azonosítottunk egy olyan Pq-rezisztens biotípust (Kecel körzetében), amelyik atrazin rezisztenciát nem mutatott. A xantofill-ciklus vizsgálatokat most már a betyárkóró négy (herbicid szenzitív, S, atrazin-rezisztens, AR,

paraquat-rezisztens, PqR és paraquat-atrazin ko-rezisztens, PqAR) biotípusán megismételve, minden kétséget kizáróan megállapíthattuk, hogy a xantofill-ciklus visszafogott fényválasza nem a paraquat-rezisztenciához, hanem az atrazin-rezisztenciához köthető és újonnan felfedett pleiotropikus hatásnak tekintendő (Váradi & Pölös 1993, Váradi et al. 1994). E vizsgálatok eredményei jelentették PhD értekezésemben részletesen ismertetett munkám kiinduló pontját.



## 1.6. Célkitűzés

A fény akklimatizációs folyamatokban fontos szerepet tulajdonítanak a kloroplasztiszokban lokalizált, xantofill-ciklusként ismert fényvédő mechanizmusnak, amely biztosítja a pigment antenna rendszerek által elnyelt, de a fotokémiai folyamatokban nem hasznosuló napfényenergia nem-fotokémiai úton történő disszipációját. A xantofill-ciklus működésének alapvető feltételei ismertek, ennek ellenére számos fontos kérdés továbbra is kutatás tárgyát képezi.

Fő célkitűzésem a D1 protein mutáns gyomnövényekben a csökkent xantofill-ciklus aktivitás okának feltárása, a xantofill-ciklus szabályozásában résztvevő belső tényezők meghatározása, illetve kapcsolata más fotoprotektív mechanizmusokkal.

Ezen belül közvetlen célul tűztem ki az alábbi kérdések megválaszolását:

- Általánosan megfigyelhető-e a xantofill-ciklus AR betyárkóró esetében (Váradí et al. 1994) tapasztalt visszafogott de-epoxidációja és a csökkent NPQ kialakulás a kétszikű AR gyomokban?
- Mi okozhatja az AR (D1 mutáns) biotípusban a xantofill-ciklus csökkent aktivitását, az elnyelt fényenergia gyengébb fotokémiai hasznosulását?
- Milyen folyamatok állhatnak az AR növények csökkent kompetíciós képessége, kisebb bioprodukciója hátterében?

Tekintve, hogy a paraquat hatása fényintenzitás függő és a PqR betyárkóró fotoszintézisének tanulmányozása során paraquat jelenlétében fényfüggő folyamatokat ismertünk föl (Váradí et al. 1990, Lehoczki et al. 1992), ezért feltételeztem, hogy a xantofill-ciklus szerepet játszhat e jelenségekben, de legalábbis tükrözhet valamely lényeges részfolyamatot, amely kapcsolatban lehet a paraquat rezisztencia mechanizmusával.

E kérdéskörben az alábbi célokat tűztem ki:

- Milyen kezdeti hatások figyelhetők meg intakt növények leveleinek gázcseréjében Pq jelenlétében?
- Hogyan alkalmazható a xantofill-ciklus, mint belső, tilakoid lumenbeli pH-érzékelő a paraquat hatásának tanulmányozásában szenzitív és rezisztens növény esetében?
- Kimutatható-e paraquat-kezeléskor szuperoxid gyökök keletkezése közvetlen, *in vivo* gyökcsapdás elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópiás méréssel?

## **2. Anyag és módszer**

### **2.1. A vizsgált növényfajok**

Kísérleteimet kivétel nélkül természetes körülmények között természetes módon szelektálódott gyomnövények AR és szenzitiv (vad) biotípusain végeztem (fotók az 1. Függelékben). Az *Epilobium adenocaulon* Hausskn. (jövevény füzike), *Senecio vulgaris* L. (közönséges aggófű), *Solanum nigrum* L. (fekete csucor) növények magjait S.W. Gawronski-tól kaptuk Lengyelországból, az *Amaranthus retroflexus* L. (szörös disznóparéj), *Chenopodium album* L. (fehér libatop) és *Erigeron canadensis* L. (betyárkóró) származási helye Magyarország. Az atrazin rezisztencia oka, minden általunk vizsgált gyomnövényben a *psbA* gén pontmutációja a 264. kodonban, amely a Ser→Gly aminosav cserét eredményezi a D1 proteinen. (Hirschberg & McIntosh 1983, Goloubinoff et al. 1984, Gawronski et al. 1992).

### **2.2. A kísérleti növények nevelése**

A növények nevelésénél a magokat először nedves kertészeti földbe helyeztük. A kikelt növényeket fajtól függően, különböző fejlettségű állapotban tenyészedényekbe ültettük át. A növényeket először alacsonyabb fényintenzitáson (növényházi körülmények között vagy növénynevelő kamrákban, ahol a maximális fotoszintetikusan aktív radiáció (PAR) nem haladta meg a  $200\text{--}300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  értéket) neveltük, azt követően pedig általában a nyári időszakban szabadföldi körülmények közé kerültek, ahol a fényintenzitás maximális értéke elérte az  $1700\text{--}1800\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR értéket.

### **2.3. A levelek fotoszintetikus pigment összetételének mérése**

A klorofill és összkarotinoid tartalom meghatározását 80%-os acetonos extraktumban Lichtenthaler (1987) spektrofotometriás módszerével végeztük. A kezelt vagy kontroll levelek középső harmadából, a főér kihagyásával 11mm átmérőjű levélkorongokat vágunk ki az extrakcióhoz.

### **A xantofill-ciklus aktivitásának meghatározása**

A xantofill-ciklus komponenseinek (VIO, ANT, ZEA) mennyiségi meghatározására HPLC-s módszert alkalmaztunk (Váradí et al. 1992). A vizsgálandó növényi minták azonos fejlettségű leveleiből, azonos méretű levélkorongokat vágunk ki, és azokat

folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk. A PAR intenzitás függésében végzett vizsgálatoknál a levélkorongokat csapvizet tartalmazó Petri-csészébe tettük és általában 1 órára különböző fényintenzitásokra helyeztük. Ezután a levélkorongokat lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és a további feldolgozásig ott tároltuk. A pigmentek feltárását Eppendorf csövekben 85:15 arányú acetón-víz extraháló oldattal végeztük, 24 órára hűtőszekrénybe helyeztük, ezután az elegyet centrifugáltuk (10 perc, 9000xg ). A xantofill-ciklus összkészletének meghatározásához a szilárd maradékot acetonnal kétszer újra extraháltuk. A pigmentek szétválasztásához 5µm átlagos szemcseméretű, 25cm-es C18 fordított fázisú (Nucleosil, vagy Hypersil) oszlopon (A) acetonitril-víz (9:1, v/v) – (B) etilacetát oldószerrendszerrel gradiens elúciót alkalmaztunk (térfogatáram: 1 ml min<sup>-1</sup>; a B% (v/v) az injektálástól mért 18. percben zérusról indulva lineáris felfutással elérte a 32%-ot, majd 6 perc alatt a 100%-ot, s újabb 6 percig ezt az értéket tartotta, ezt követően pedig 10 percen át az A-eluenssel hoztuk egyensúlyba az oszlopot). A xantofill-ciklus pigmentek mennyiségét 450 nm-nél detektáltuk. A kapott kromatogramok integrálása után, a meghatározott területek alapján kiszámoltuk a VIO, ANT és ZEA mennyiségét, vagy %-os megoszlását, illetve a  $DEI = (ANT + ZEA) / (VIO + ANT + ZEA)$  képlettel definiált, ún. de-epoxidációs indexet, vagy a szakirodalomban általánosan használt ún. epoxidációs indexet ( $E = (VIO + 0,5 * ANT) / (VIO + ANT + ZEA)$ ). A méréseket kezdetben LKB 2249 gradiens pumpa, 20 µl-es Rheodyne injektor, Nucleosil-100 C18/5 µm/250x4.6 mm oszlop, LKB 2151 UV/VIS detektor (450 nm), Nelson interface & software/IBM XT összeállítású műszersoron, későbbiekben hűthető automata mintaváltóval felszerelt Perkin-Elmer Series 200 PC-vezérelt HPLC berendezésen végeztük.

## **2.4. A levelek fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációjának mérése**

### **2.4.1. A fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció fényválasz görbéinek felvétele**

A CO<sub>2</sub>-asszimiláció fényválasz görbéinek felvétele ADC (England) LCA-3 típusú infravörös gázanalizátorral történt. A gázáramlás sebessége 400 ml/min, rotaméterrel szabályozott. A referencia levegő széndioxid tartalmát 340 ppm-re állítottuk be. A fotoszintézist aktiváló fény intenzitását általában 30-1800 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> között változtattuk. A levélkamrában elhelyezett leveleket 10 perces sötét adaptáció után hőszűrőn (Melles Griot, Irvine, CA, USA) keresztül diavetítővel (150W/24V halogén izzó, GE) világítottuk meg. A fény intenzitását a fényforrás és a levélkamra közötti távolság változtatásával érték el. 7 perces megvilágítás minden fényintenzitáción



elegendő volt a széndioxid asszimiláció egyensúlyi értékének eléréséhez. A nettó fotoszintetikus széndioxid asszimiláció sebességének illetve más levél gázcsere jellemzők ( $g_s$ ,  $E$ ,  $T_{\text{levél}}$ ) kiszámítása a von Caemmerer & Farquhar (1981) által leírtak szerint történt a műszerbe beépített program segítségével.

#### **2.4.2. A fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció sebességének függése az intercelluláris (szubsztomatális) CO<sub>2</sub> koncentrációtól (A/c<sub>i</sub> görbék)**

Az A/c<sub>i</sub> görbék megszerkesztéséhez az ADC (England) LCpro típusú hordozható fotoszintézis mérőrendszerével, növénynevelő kamrában nőtt növényeken, mesterséges megvilágítás mellett végeztünk méréseket. A fényforrás vörös (660 nm) és kék színű (470 nm) LED-ek keveréke, amelynek fénye 5-10% kék összetevőt tartalmaz. A levélfelszínre érő sugárzás fluxusa  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt. A mérőkamrába befogott levelet először a nevelési környezetnek megfelelő CO<sub>2</sub> koncentráción ( $400\text{--}450 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) megvilágítva 10 percig akklimatizáltuk. Ezt követően a  $0\text{--}400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> koncentráció tartományban  $50 \mu\text{mol mol}^{-1}$  lépésközzel, 10-10 perc beállási időt hagyva végeztük el a CO<sub>2</sub>-fixáció (A) mérését. A telítési asszimilációs ráta jellemzésére  $1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> koncentráció mellett történt a mérés. A mérési adatokat 2-3 növény összesen legalább 5 levelén gyűjtöttük. A mérési adatokat (A) az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció (c<sub>i</sub>) függvényében Excel grafikonon ábrázoltuk, majd a c<sub>i</sub> =  $0\text{--}200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  tartományban lineáris regresszióval egyenest illesztettünk a pontokra, amelynek a meredeksége ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) az irodalom szerint arányos a Rubisco aktivitással ill. az extrahálható Rubisco mennyiséggel (Farquhar et al. 1990).

#### **2.4.3. A fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció időbeli alakulásának mérése**

Ebben az esetben az ADC (England) LCA-3 típusú infravörös gázanalizátor levélkamrájába helyezett kezeletlen kontroll, majd ezt követően sötétben paraquattal kezelt növényen lévő intakt levelek széndioxid-asszimilációját  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR megvilágítás mellett az idő függésében regisztráltuk. A mérést 5 másodperces lépésközzel 1 órán keresztül végeztük.

#### **2.4.4. Klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása**

A klorofill fluoreszcencia mérése a fotoszintetikus aktivitás indirekt mérési eljárásai közé tartozik, amely fontos információkat nyújt a fotoszintetikus apparátus működéséről. Munkánk során a hagyományos klorofill fluoreszcencia indukciós (Kautsky-effektus) és



ún. klorofill fluoreszcencia quenching analízis (modulációs elven működő fluorométerekkel) módszereit is alkalmaztuk. Ezeket a méréseket saját fejlesztésű klorofill indukciómérő berendezéssel (Szigeti et al. 1988), vagy a Hansatech (England) gyártmányú Dual Chanel Modulated Fluorometerrel és legújabbán pedig a PAM-200 (Teaching PAM, Walz, Germany) amplitudó és frekvencia-modulált klorofill fluorométerrel végeztük. A fluoreszcencia mérések részletes leírása közleményeinkben megtalálható (Váradi et al. 1994a, 2000, 2003, Darkó et al. 1996) A fluoreszcencia mérések során a van Kooten & Snel (1990) szerinti nómenklaturát alkalmaztuk, a kioltási paramétereket ( $qP$ ,  $\Delta F/F_m'$  és NPQ) rendre Schreiber et al. (1986), Genty et al. (1990) és Schreiber et al. (1986) szerint számítottuk ki (lásd: 2. Függelék).

### **Fénygátlás vizsgálata:**

A levelekből kivágott 11mm átmérőjű levélkorongokat csapvizet tartalmazó Petri-csészébe helyeztük, amelyet aztán az  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitást biztosító jódgőzlámpa alá tettük. A minták és fényforrás között hőszűrőként folyamatosan csapvizet áramoltattunk egy plexikádon át. A folyamatos levegőcserét (és részben hűtést) ventilátorral biztosítottuk. A fénygátlás mértékének jellemzésére az  $F_v/F_m$  klorofill fluoreszcencia indukciós paramétert használtuk, amelyet a különböző időpontig megvilágított levélkorongokon határoztunk meg 10 perces sötétadaptálás után. Egy-egy időpontban általában 8-10 levélkorongot mértünk meg, és ezek átlagértékeit tüntettük föl az ábrákon.

### **Fluoreszcencia indukció fényválasz görbéinek felvétele**

A fluoreszcencia paraméterek fényválasz görbéinek mérését excizált leveleken a PAM-200 (Teaching PAM, Walz, Germany) amplitudó és frekvencia-modulált klorofill fluorométerrel végeztük. Ennek során a sötéthez adaptálódott leveleken először megtörtént az  $F_v/F_m$  meghatározása. Ezt követően a leveleket 5 percig fényhez szoktattuk ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mialatt megtörténhetett a Calvin-ciklus enzimeinek aktiválódása, majd elkezdődött a fényválasz görbe felvétele. Ez a  $60\text{-}1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR tartományban 10 lépcsőben történt úgy, hogy minden egyes fényintenzitásnak 5 percig tettük ki a levelet, melynek utolsó 10 másodpercében telítési fényimpulzusok alkalmazásával megtörtént a kioltási paraméterek mérése. A mérés során vörös ( $\lambda_{\text{max}}=655\text{nm}$ ) aktinikus fényt,  $0.04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  modulált mérőfényt és  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR intenzitású telítési fényimpulzusokat alkalmaztunk.

## **2.6. Szuperoxid-gyökök kimutatása ESR eljárással**

A paraquat kezelés és megvilágítás hatására a betyárkóró szenzitív és paraquat-rezisztens biotípusainak levelében bekövetkező szuperoxid gyökképződést gyökcsapdás ESR méréssel követtük nyomon. A szuperoxid anion gyökök csapdázását Tiron (4,5-dihidroxí-1,3-benzoldiszulfonsav-dinátriumsó) segítségével végeztük (Greenstock & Miller 1975). A Tiron egy diamágneses kinon vegyület, amely szuperoxiddal reagálva stabil paramágneses gyökké alakul s ez ESR jelet ad. A vizsgált, mintegy  $1.5 \text{ cm}^2$  levélfelületre  $20 \mu\text{l}$   $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  (az ajánlott üzemi oldatkoncentráció 1/5-e) paraquat-oldatot vittünk fel egyenletesen, azután a levelet a kezelési időnek megfelelő időtartamig  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású fotoszintetikusan aktív fénnel (PAR) megvilágítottuk. Ezt követően a levelet 5 percre sötétbe helyezve elvégeztük a gyökcsapda bejuttatását ( $20 \mu\text{l}$  10 mM Tiron). A paraquat-kezelt betyárkóró levelekben megvilágítás hatására keletkező szuperoxid méréséhez a csapda inkubálása után először sötétben mértünk egy ESR spektrumot, majd 2 perc fénykezelést követően, megvilágítás mellett végeztük el a fény indukálta folyamatok okozta jel mérését (3 perces spektrumfelvétel). A fény mínusz sötét ESR jeleket a kezelési idő függvényében ábrázoltuk. A zérus időponthoz tartozó mérést paraquat alkalmazása mellett, de elővilágítás nélkül végeztük. A méréseket betyárkóró levágott intakt levelein végeztük. Az alkalmazott gyök csapdázási technika lényegéből adódóan az egy-egy időponthoz tartozó fény mínusz sötét méréseket különböző leveleken kellett elvégeznünk. A méréseket két különböző időszakban, különböző fejlettségi állapotban levő növényi anyagon, 5-5 ismétlésben végeztük el.

Az ESR spektrumokat egy Bruker ECS-106 típusú spektrométerrel szobahőmérsékleten, 9.45 GHz mikrohullámú frekvenciával, 16 mW mikrohullámú teljesítménnyel és 100 kHz modulációs frekvenciával mértük (Hideg et al., 1995). Mivel a csapda ESR spektrumának alakja nem változott, a mérések kiértékelését a jel amplitúdók összehasonlítása alapján valósítottuk meg.

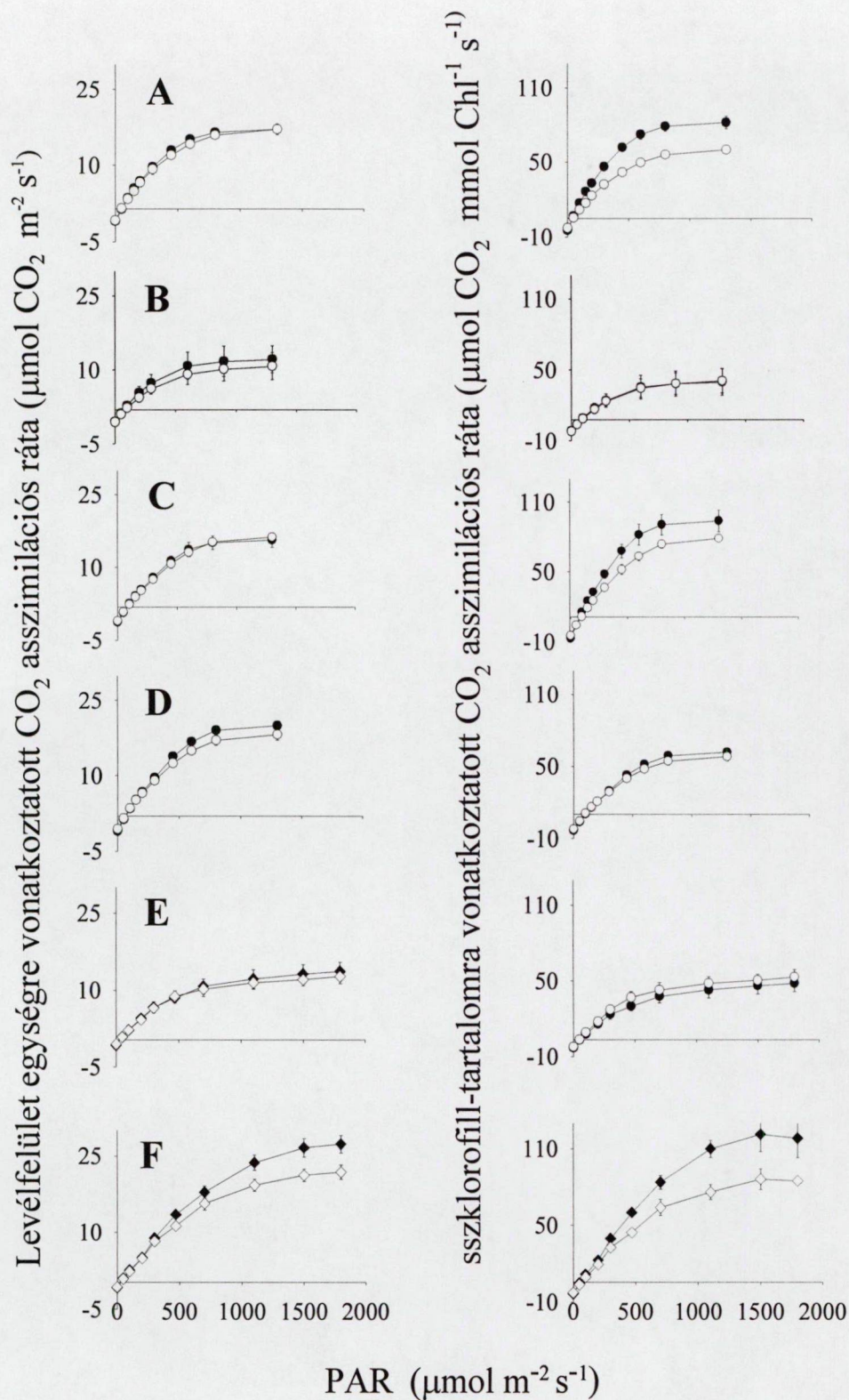
### 3. Eredmények és megvitatás

#### 3.1. Vizsgálatok az AR gyom biotípusokkal

##### 3.1.1. Fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció és növekedés

A 3.1.1. ábra bemutatja a vizsgált kétszikű gyomfajok (a fehér libatop, a füzike, a közönséges aggófű, a fekete csucor, a betyárkóró és a szőrös disznóparéj) AS és AR biotípusainak természetes fényen nevelt egyedein különböző fényintenzitásokon laboratóriumi körülmények között mért CO<sub>2</sub>-asszimilációs rátáit. Az asszimilációs ráták és a fényteltési pontok növényfajtól függően eltérőek voltak. A szőrös disznóparéj messze kimagasló fotoszintetikus teljesítményt nyújtott, míg a füzike és a betyárkóró voltak a leggyengébb teljesítményűek. A szőrös disznóparéj CO<sub>2</sub>-asszimilációs rátája – C4-es karakteréből fakadóan – a fényintenzitás növelésével nem futott telítésbe, míg a vizsgált C3-as kétszikűek különböző fényintenzitás tartományokban telítésbe futottak. A füzike és a betyárkóró esetében találtuk a legkisebb telítési fényintenzitásokat. Az egységnyi levélfelületre vonatkoztatott értékekben a szőrös disznóparéjt leszámítva nem tapasztaltunk különbséget a biotípusok között, míg az összes klorofilltartalomra vetített asszimilációs rátákban a szőrös disznóparéj mellett a fehér libatop és a közönséges aggófű esetében is különbséget láthattunk az AR biotípus rovására. Ez utóbbi megváltozott pigment sztöchiometriára utal az AR növényben. Eredményeim jó egyezést mutatnak a van Oorschot & van Leeuwen (1984) által leírtakkal.

Az eddig ismertetett méréseket laboratóriumi körülmények között, 23-26°C hőmérséklet tartományban végeztem. A fekete csucor AS és AR biotípusai esetében módomban állt kánikulai körülmények között (35-37°C), szabadtéri mérések elvégzésére (3.1.1. táblázat, szürke sorok). A méréseket 2-3 óra elteltével mérsékeltebb hőmérsékleten (28-30°C, 3.1.1. táblázat, fehér sorok) és mesterséges fényforrás alkalmazásával, ugyanazokon a növényeken megismételtem. A fényintenzitást tekintve mindkét esetben a telítési szakaszban mértem, rövid ideig (10-15 perc) fénygátlásnak kitéve a növényt. Az asszimilációs rátákat összehasonlítva egyértelműen láthatjuk, hogy mérsékeltebb melegben az AR biotípusok csak kis mértékben maradnak el az AS biotípusoktól, komolyabb hőstressz esetén viszont igen jelentőssé fokozódik ez az eltérés. Ez abból adódott, hogy – míg az atrazin-szenzitív biotípusoké a hőmérséklettel nőtt – az atrazin-



**3.1.1. ábra** A CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta fényválasz görbéje a fehér libatop (A), füzike (B), közönséges aggófű(C), fekete csucsor (D), betyárkóró (E) és szőrös disznóparéj (F) AR (AR, üres szimbólumok) és szenzitív (AS, teli szimbólumok) biotípusának intakt növényen lévő leveleiben. A méréseket 340 vpm CO<sub>2</sub> és 21 % (v/v) O<sub>2</sub> levegő összetétel mellett 27°C-on végeztük és az eredményeket egységnyi levélfelületre (bal oldali diagramok) és összes klorofill tartalomra (jobb oldali diagramok) vetítve egyaránt kiszámítottuk. Az adatok legkevesebb 3 növényről származó legkevesebb 5 ismételtes átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.



rezisztenciát hordozó biotípusok asszimilációs rátája nagyobb hőmérsékleten kisebbnek bizonyult. Ebből úgy tűnik, mintha a megfigyelési hőmérséklet tartomány (28-37°C) az AS növény esetében még a fotoszintézis hőmérséklet optimuma alá, míg az AR növény esetében már a fölé esne. A párologtatási sebesség (E) közel azonosan alakult a biotípusokban, kevésbé meleg körülmények között csaknem a felére csökkent, amely a számított sztóma vezetőképesség ( $g_s$ ) adatokon is látszik. Az asszimilációs ráták alakulása azonban nem volt szinkronban a sztóma nyitottság alakulásával, tehát egyszerű sztóma limitációról nem beszélhetünk. A jó vízellátottsággal összhangban lévő jelentős párologási sebességből adódóan a napfényen végzett mérések során az ebből származó hűtőhatás elegendő volt, hogy megakadályozza a levelek túlhevülését, míg a mesterséges fényforrással és 7-9°C-kal kisebb hőmérsékleten végzett mérések során a jelentősen csökkent mérvű párologás csekélyebb hűtőhatást biztosított a levelek számára (első esetben  $\leq 0.3^\circ\text{C}$ , míg utóbbi esetben 1.6-2.5°C közötti volt a levelek fölmelegedése).

3.1.1. táblázat

A hőmérséklet hatása a fekete csucsor biotípusainak levél gázcsere paramétereire (n=5)

Biotípus		$e_{ref}$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$c_{ref}$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$T_{levegő}$ (°C)	$T_{levél}$ (°C)	$c_i$	E	$g_s$	A ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
S	átlag	13.6	365	1945	35.8	36.0	223	10.4	1.01	25.4
	szórás	0.1	1	76	2.6	1.8	10	1.4	0.19	1.3
	átlag	11.3	364	1760	27.7	29.6	202	5.7	0.51	23.2
	szórás	0.4	0	0	0.1	0.6	12	0.1	0.06	0.3
AR	átlag	13.7	366	1857	37.4	37.2	260	11.3	0.99	17.8
	szórás	0.4	2	89	3.4	2.9	9	1.8	0.18	1.7
	átlag	11.0	364	1760	28.2	30.4	213	5.7	0.44	19.7
	szórás	0.2	1	0	0.2	0.3	4	0.2	0.06	1.0

**Ahol:**  $e_{ref}$  = a mérőcellába belépő levegő vízgőztartalma,  $c_{ref}$  = a mérőcellába belépő levegő CO<sub>2</sub>-tartalma,  $C_i$  = intercelluláris, szubsztomatális CO<sub>2</sub>-koncentráció, E = transzspiráció sebesség,  $g_s$  = sztóma vezetőképesség, A = a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció sebessége. **S** = szenzitív, **AR** = atrazin-rezisztens, **szürke cellák** = napfénynek kitett levelek, **fehér cellák** = mesterséges fényforrással végzett mérések.

Laboratóriumi körülmények között  $A/c_i$  görbék felvételét is elvégeztem, hogy elemezhessem az esetenként megfigyelhető gyengébb asszimilációs teljesítmény lehetséges okait. A fotoszintetikus szén-anyagcsere egyensúlyi modelljéből levezethető, hogy az  $A/c_i$  válaszgörbe két szakaszra osztható: egy kezdeti lineáris válaszra, ahol a karboxiláció hatékonysága (a Rubisco aktivitás) határozza meg a válaszgörbe meredekségét ( $dA/dc_i$ ) és egy inflexiót követő lassúbb emelkedésű szakaszra, vagy

platóra, ahol a  $dA/dc_i$  értéke zérushoz közelít, mert az A értékét a karboxilezési reakció szubsztátja, a RuBP limitálja. Az AS és AR biotípusok összehasonlító vizsgálatai szerint (Polyánka Hilda készülő PhD dolgozata) a Rubisco aktivitásban nem volt szignifikáns különbség.

Megállapítható tehát, hogy az atrazin-rezisztencia, illetve a D1 Ser<sub>264</sub>→Gly pontmutáció általában nem okoz kifejezett és egyértelmű visszaesést a laboratóriumi körülmények között mérhető fotoszintetikus teljesítményben, jóllehet a fotoszintetikus fényreakció és ahhoz kapcsolódó védőmechanizmusok kifejezetten érintve vannak. Az AR biotípusokról általánosan azt tartják, hogy rosszabb az ökofiziológiai plaszticitásuk, gyengébb a kompetitív képességük, ezáltal herbicidmentes környezetben visszaszorulnak a populációban. A minden körülmények között tagadhatatlanul megmutatkozó növekedésbeli különbség (lásd például a 3. Függelék fotóját).

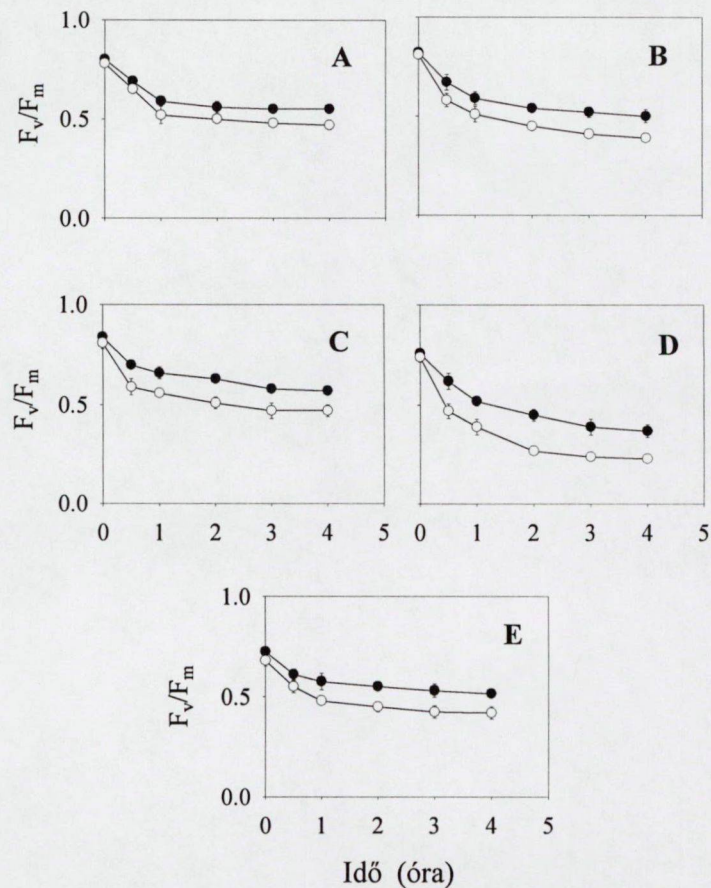
### **3.1.2. Az elnyelt fényenergia hasznosulása**

Az AR növényekről tudott, hogy súlyosabban szenvednek a fénygátlástól, mint szenzitív párjaik. Több órás fénygátlást követően ezt rendszerint a PSII optimális fotokémiai hatékonyságának ( $F_v/F_m$ ) kifejezettebb romlásával és a konstans fluoreszcencia ( $F_0$ ) jelentősebb megnövekedésével demonstrálják. Amint azt a fehér libatop, a füzike, a közönséges aggófű, a fekete csucsor és a szőrös disznóparéj esetében a 3.1.2. ábra bemutatja, az AR biotípusban az  $F_v/F_m$  paraméter gyorsabban csökkent és kisebb értékeket vett föl egy kifejezett fénygátlás állapotában az AS biotípushoz képest, miközben az  $F_0$  az AR növények levelében nagyobb mértékű növekedést mutatott (nincs bemutatva). A betyárkóró esetében a Váradi et al. (1994a) és Darkó et al. (1996) dolgozatokban találunk hasonló adatokat. Ezek a széles körben elfogadott fluoreszcencia paraméterek azonban, amelyek jól jelzik a levelekben a fénygátlás állapotát, nem adnak információt sem a fotoszintetikus széndioxid asszimiláció teljesítményéről, sem pedig a PSII fotokémiai folyamatok aktuális hatékonyságáról, vagy az elnyelt fényenergia hasznosulásáról.

A levelek által abszorbeált fényenergia hasznosulásának elemzése céljából modulált méréstechnika segítségével gyűjtöttünk klorofill *a* fluoreszcencia adatokat. Az ezekből számított fluoreszcencia kioltási paramétereket (NPQ, nem-fotokémiai kioltás;  $qP$ , fotokémiai kioltási koefficiens;  $\Delta F/F_m'$ , a PSII fotokémiai folyamatok relatív kvantumhatásfoka) különböző aktinikus fényintenzitásokon határoztuk meg a fehér libatop, a füzike, a közönséges aggófű, a fekete csucsor és a szőrös disznóparéj AS és



AR biotípusai esetében (3.1.3. ábra). Hasonló eredményeket közöltünk a betyárkóróra vonatkozóan is (Darkó et al. 1996).



**3.1.2. ábra** A fénygátlás kialakulásának bemutatása a PSII optimális hatásfokának ( $F_v/F_m$ ) fokozatos csökkenése segítségével a fehér libatop (A), a füzike (B), a közönséges aggófű (C), a fekete csucsor (D) és a szőrös disznóparéj (E) AR (AR, üres szimbólumok) és szenzitív (AS, teli szimbólumok) biotípusának leveleiben. Az adatok 3 független kísérletből származó 8 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő karaktereknél. Hasonló adatokat a betyárkóró esetében Darkó et al. (1996) dolgozatában találunk.

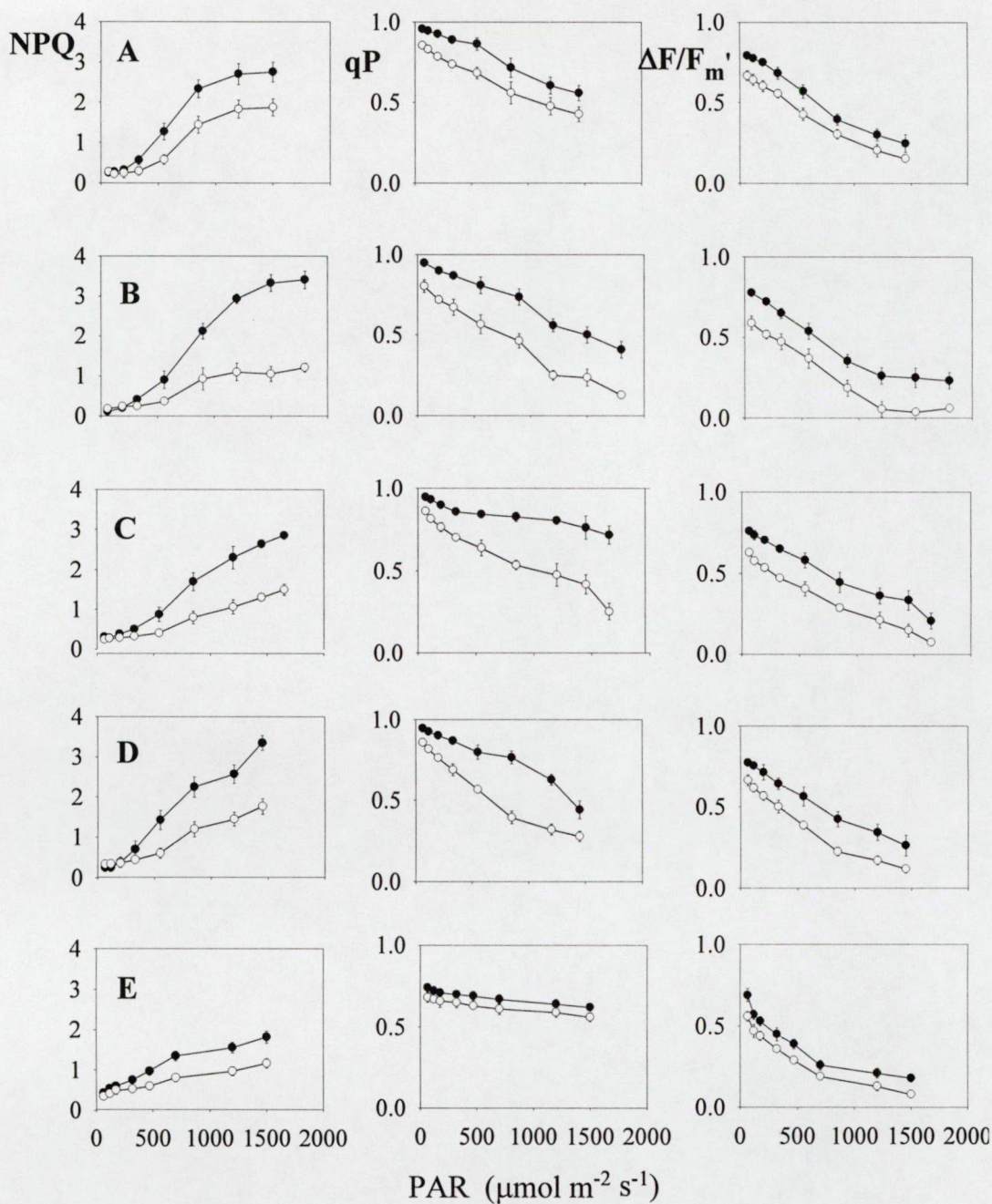
Megfigyelhetjük, hogy az NPQ nagyobb aktinikus fényintenzitásokon az AS biotípusban rendszerint 2-3 közötti értéket vesz föl, míg az AR növényekben hasonló körülmények között 2 alatt (többnyire 1 körül) marad. Az aktinikus fényintenzitás növelésével a qP értéke természetesen csökken, de az AR növényeké mindig – még nagyon kis gerjesztési intenzitás esetén is – az AS növényeké alatt marad. A  $\Delta F/F_m$  paraméter a qP-hez hasonló lefutást mutat és szintén megerősíti a biotípusok közötti eltérést. Ez a paraméter, amely a PSII aktuális kvantumhasznosítására jellemző, alkalmas egy látszólagos elektrontranszport sebesség kiszámítására. Ez a beeső PAR fotoszintetikus pigmentek révén elnyelődő mintegy 82%-ának elméletileg a PSII-re jutó

fele ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), amely ezáltal egy adott fényintenzitáson arányos a  $\Delta F/F_m'$  paraméter értékével. Ez a 3.1.3. ábra alapján az AR növények minden fényintenzitáson, egyöntetűen lassúbb elektrontranszportját jelenti a vad (AS) biotípushoz képest.

A lassúbb elektrontranszport okozója lehet egy csökkent mértékű lumen savanyodásnak, amely az NPQ qE komponensének csökkenését eredményezheti. Dolgozatomban az atrazin rezisztencia kapcsán az NPQ mellett nem mutatom be a qE értékeket, mert bebizonyosodott, hogy részaránya mindig ugyanolyan arányú marad (lásd: Darkó et al. 1996), így az általunk vizsgált kérdést illetően nem hordoz további információt. Demmig-Adams et al. (1996a) klorofill fluoreszcencia kioltás paramétereinek segítségével jellemezték a PSII által elnyelt fényenergia allokációját, sorsát, a fotokémiai, hődisszipációs és károsító folyamatok közötti megoszlását. Modelljüket számos növényfaj napfényen és árnyékban nevelt egyedeire alkalmazva ellenőrizték. Elvégeztük a megfigyelt kétszikű növényfajok intenzív fényen nevelt AS és AR biotípusainak ilyen fajta összehasonlítását (3.1.4. ábra). Ebben a terminológiában a PSII antenna által abszorbeált fény azon része, amely a PSII fotokémiai folyamataiban hasznosul a  $P=(F_v'/F_m')qP$  formula szerint becsülhető, míg a disszipáció részaránya a  $D=1-F_v'/F_m'$  képlet alapján közelíthető (ahol  $F_v'$  az aktuális változó fluoreszcencia ( $F_v'=F_m'-F_0'$ ) egy adott fényintenzitáson). A tanulmányozott vad (AS) biotípusok meglehetősen eltérő fotokémiai hasznosulási részarányokat mutattak, de azonos növényfaj AR biotípusa mindegyik esetben jelentősen csökkent fotokémiai hasznosulást mutatott. A teljes disszipációs hányad becsült értéke általában nagyobbak adódott az AR biotípusokban, de a fennmaradó végső gerjesztési energiafelesleg még így is nagyobbak adódott az AR növényekben. Azt mondhatjuk, hogy a modell alkalmazása a fotokémiai hasznosulást tekintve egyértelműnek látszó következtetésre vezetett, míg a disszipációnál felhívja a figyelmünket egyéb disszipációs mechanizmusok létezésére. Megállapítható, hogy a D1 protein mutánsok esetében a modellt csak kellő körültekintéssel szabad alkalmaznunk.

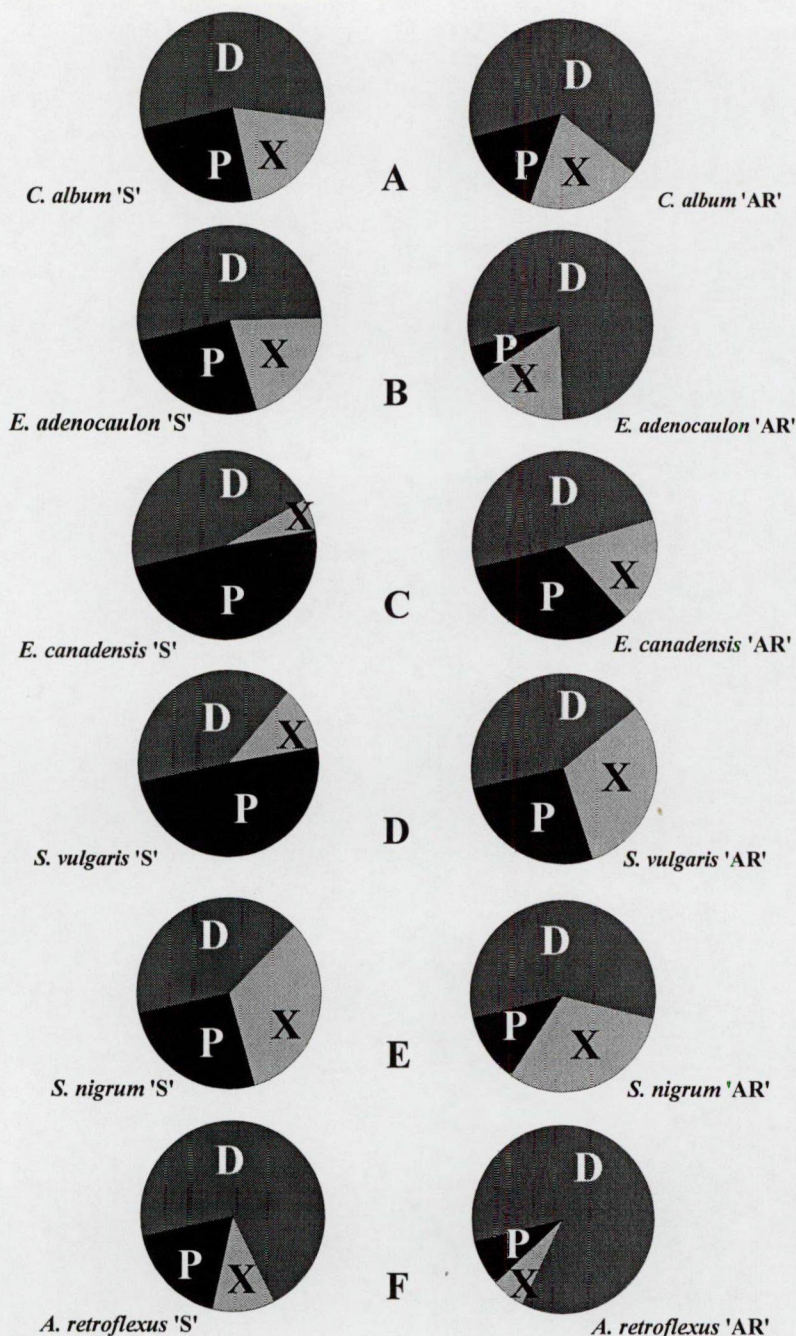
A PSII fotoprotekcióját tekintve a qP és az NPQ hozzájárulását az  $(1-qP)/NPQ$  aránnyal jellemezhetjük, amelyet szokás fénystresszel szembeni érzékenységi indexnek, vagy gerjesztési nyomásnak is nevezni. A fehér libatop, a fűzike, a közönséges aggófű, a fekete





**3.1.3. ábra** A nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás (NPQ, baloldalt), a fotokémiai kioltási együttható (qP, középen) és a PSII fotokémiai hatásfoka (jobb oldalt) a fehér libatop (A), a fűzike (B), a közönséges aggófű (C), a fekete csucsor (D) és a szőrös disznóparéj (E) AR (AR, üres szimbólumok) és szenzitív (AS, teli szimbólumok) biotípusának leveleiben. Hasonló adatokat a betyárkóró esetében Darkó et al. (1996 és 2000) dolgozataiban találunk. Az adatok 3 független kísérletből származó 4 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.





**3.1.4. ábra** A PSII antenna által elnyelt gerjesztési energia megoszlása a PSII fotokémiai hasznosulás ( $P=(F_v'/F_m') \cdot qP$ , fekete körcikkek), a hődisszipáció ( $D=1-F_v'/F_m'$ , sötétszürke körcikkek) és a fennmaradó gerjesztési fölösleg (X, világosszürke körcikkek) között a fehér libatop (A), a füziké (B), a közönséges aggófű (C), a fekete csucor (D), a betyárkóró (E) és a szőrös disznóparéj (F) szenzitív (AS, baloldali körcikkek diagramok) és AR (AR, jobboldali körcikkek diagramok) biotípusának leveleiben. Az adatokat a 3.1.5. ábrán bemutatott eredményekből, illetve a betyárkóró esetében Darkó et al. (1996, 2000) alapján számítottuk ki.

csucсор és a szőrös disznóparéj AS és AR biotípusai esetében a 3.1.5. ábra diagramjain láthatjuk a fényérzékenységi paraméter fényintenzitás függését. Az adatokat a 3.1.6. ábrán bemutatott, illetve a betyárkóró esetében publikált dolgozatainkban (Darkó et al. 1996, 2000) található eredményekből és ismételt mérések adataiból számítottuk ki.

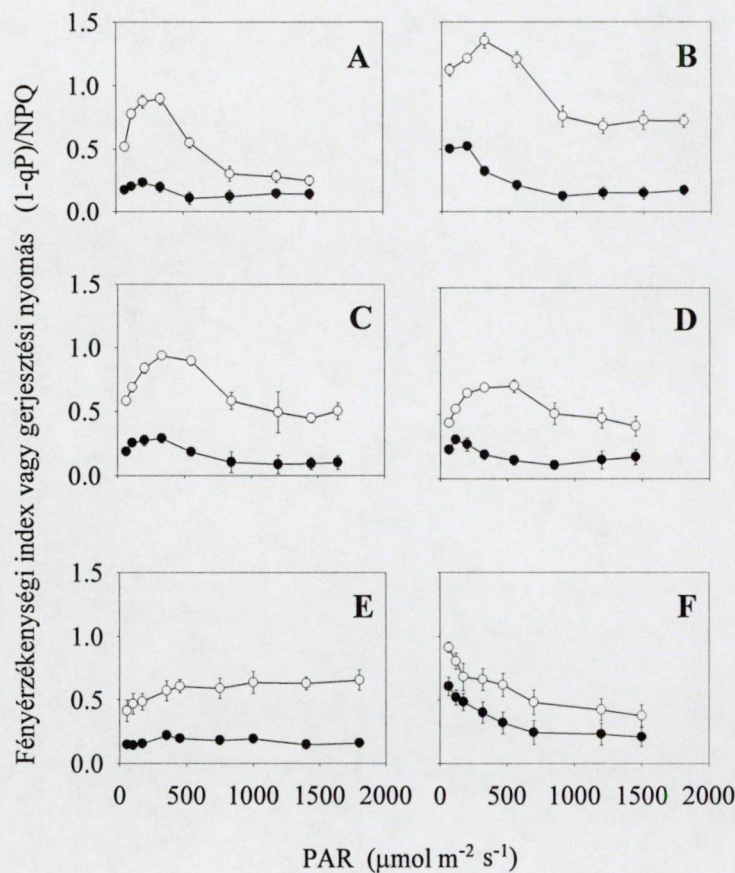
Az AS biotípusok esetében a fényérzékenység meglehetősen konstans és általában 0.1 és 0.3 közötti értéket mutat, míg az AR növényeknél időnként eléri, sőt meg is haladja az 1.0 értéket. A betyárkórót leszámítva az összes AR biotípusnál megmutatkozik egy különös fényérzékenységi index növekedés a kisebb fényintenzitásokon ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  körül), ami a kis fényintenzitáson is gyenge fotokémiai hasznosulás és a csökkent mérvű NPQ folyamat halmozódó hatása lehet.

Markáns különbséget találtunk tehát az AS és AR biotípusok között az abszorbeált fény fotokémiai és disszipációs allokációját tekintve. A paraméterek becslését Demmig-Adams et al. (1996a) szerint végeztük, feltételezve a PSI és PSII összehangolt működését. A fluoreszcencia méréseket  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson végeztük, ami közel azonos volt a növénynevelés során előforduló maximális fényintenzitással. A vad biotípusok is jellegzetes különbségeket mutattak. A legnagyobb arányú PSII fotokémiai hasznosítást a betyárkóró és a közönséges aggófű, míg a legrosszabb értékeket a fekete csucсор esetében figyeltem meg (3.1.4. ábra).

A legfontosabb megállapítás az, hogy az AR növények egyöntetűen csökkent fotokémiai hasznosulást mutatnak. Ez egyöntetűen azt eredményezi, hogy a D1 protein mutáns növényekben az elnyelt fényenergia jóval nagyobb hányada jelentkezik fölöslegként. Ellentmondásnak tűnik, hogy az AR biotípusban nagyobbra becsülhető disszipáció mellett visszafogottan működő xantofill-ciklust és megnövekedett fényérzékenységi indexet figyelhetünk meg. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy az AR növények más alternatív védőmechanizmusokkal is rendelkeznek, amelyek közé sorolható a felgyorsult D1 protein lebomlás-helyreállítás is. Természetesen az is kérdéses marad, hogy az allokációs modell egyáltalán alkalmazható-e az AR mutánsokra, vagy sem. Hasonló kérdés vetődik fel a fényérzékenységi index esetében is (3.1.5. ábra), amely az AS növények esetében jól egyezik a szakirodalomban más növényfajokra, különböző nevelési körülmények között kapott értékekkel, viszont a kisebb fényintenzitások tartományában az AR növények esetében szokatlanul nagyra mutatkozik. Megjegyzendő azonban, hogy hasonló nonlinearitás a kis fényintenzitások tartományában az AS biotípusoknál és a szakirodalomban más növényfajoknál szintén előfordul, de e fölött a formula leírói is nagyvonalúan elsiklottak. Eddigi eredményeink



alapján nem tudjuk eldönteni, hogy mutáns növényeink esetében az itt bemutatott paraméter becslések előfeltételei maradéktalanul teljesülnek-e. Úgy tűnik, hogy a C4-es kétszikű szőrös disznóparéj mind a gerjesztési energia allokációs modell alkalmazása, mind pedig a fényérzékenységi index számítás eredményei alapján kilóg a sorból, a fluoreszcencia mérésekből származtatott ilyen típusú mérőszámok bizonyára eltérő elméleti alapot igényelnének.



**3.1.5. ábra** A fényérzékenységi index (vagy más megközelítésben az ún. gerjesztési nyomás,  $[1-qP]/NPQ$ ) alakulása a fényintenzitás függvényében a fehér libatop (A), a fűzike (B), a közönséges aggófü (C), a fekete csucor (D), a betyárkóró (E) és a szőrös disznóparéj (F) szenzitív (AS, teli szimbólumok) és AR (AR, üres szimbólumok) biotípusának leveleiben. Az adatokat a 3.1.5. ábrán bemutatott, illetve az *Erigeron canadensis* esetében Darkó et al. (1996 és 2000) dolgozataiban található eredményekből számítottuk ki ( $n=12$ ). A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.

Az AR növények minden körülmények között bizonyítottan kisebb hatásfokkal végzik az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosítását. Ez azt eredményezi, hogy az AR növényeknek akár gyenge, akár erős megvilágítás mellett nagyobb gerjesztési energiatöbbletet kell hatástalanítaniuk. Az ezt szolgáló, fokozottan igénybe vett védőmechanizmusok tehát folyamatosan nagyobb arányban vannak el erre a célra az



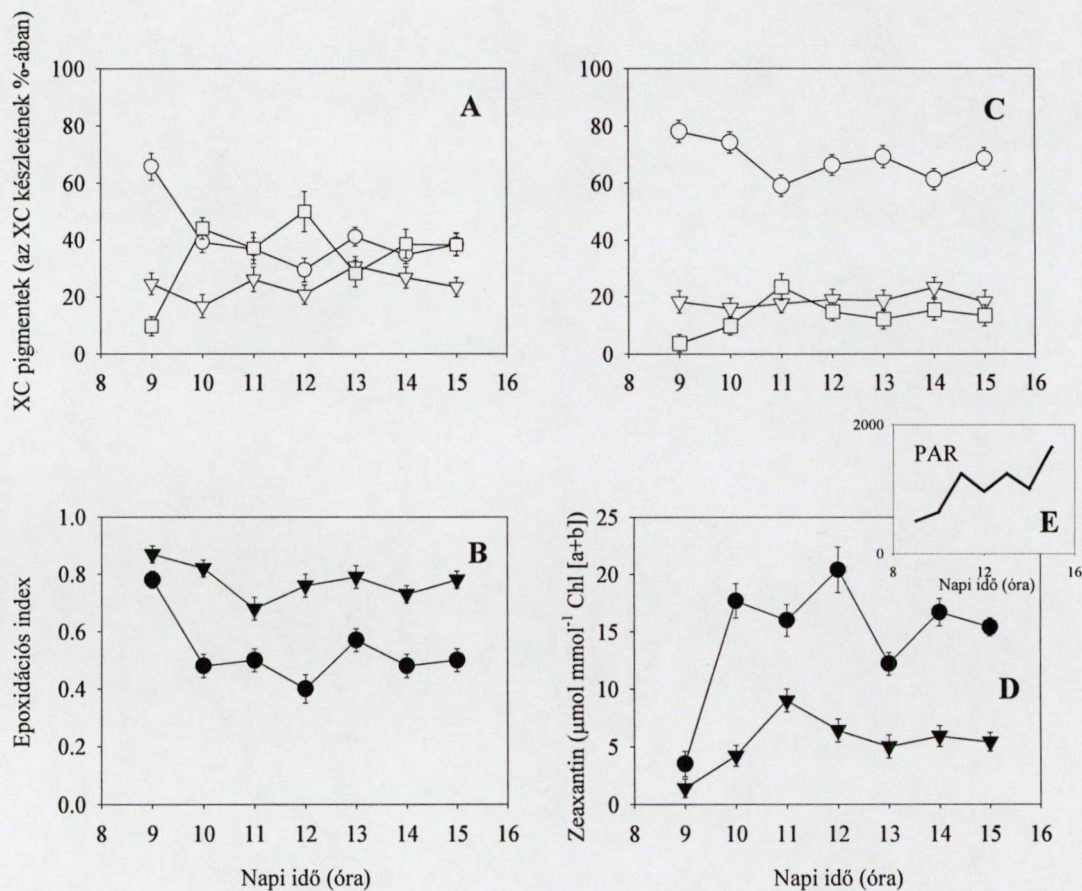
asszimilátákból és a megtermelt redukáló ágensekből, ami összességében eredményezheti az AR növények kisebb növekedési erélyét.

### **3.1.3. A xantofill-ciklus működése a D1 mutáns gyomnövényekben**

A xantofill-ciklus visszafogott fényválaszát tapasztalva az PqAR biotípusban (Váradi & Pölös 1993) feltételezhettem, hogy a nagyobb fényérzékenység és a fénygátlással szembeni nagyobb érzékenység hátterében a ZEA-függő energia disszipációs mechanizmus rosszabb hatékonysága húzódik meg. A PqAR betyárkóró esetében megfigyelt – és kezdetben a paraquat rezisztenciával összefüggésben vizsgált (Váradi & Pölös 1992, 1993) – visszafogott mértékű fény indukálta ZEA képződésről bebizonyosodott, hogy egy atrazin rezisztenciához kapcsolt jelenséggel állunk szemben (Váradi et al. 1994). Kezdetben szabadföldi körülmények között gyűjtöttünk és fixáltunk levélkorong mintákat a HPLC-s karotinoid elemzéshez. Példaként egy ilyen típusú, óránkénti napi mintavételi sorozatból származó adatsort mutatunk be a betyárkóró AS és AR biotípusa esetében a 3.1.6. ábrán, s egy inzerten láthatjuk a beeső fotoszintetikusan aktív fényintenzitás (PAR) mintavételkor mért értékeit is. Jól látható, hogy az AR biotípusban a megfigyelt délelőtti, déli és koradélutáni időszakban egyaránt szignifikáns volt a ZEA képződés lemaradása a szenzitív biotípushoz képest.

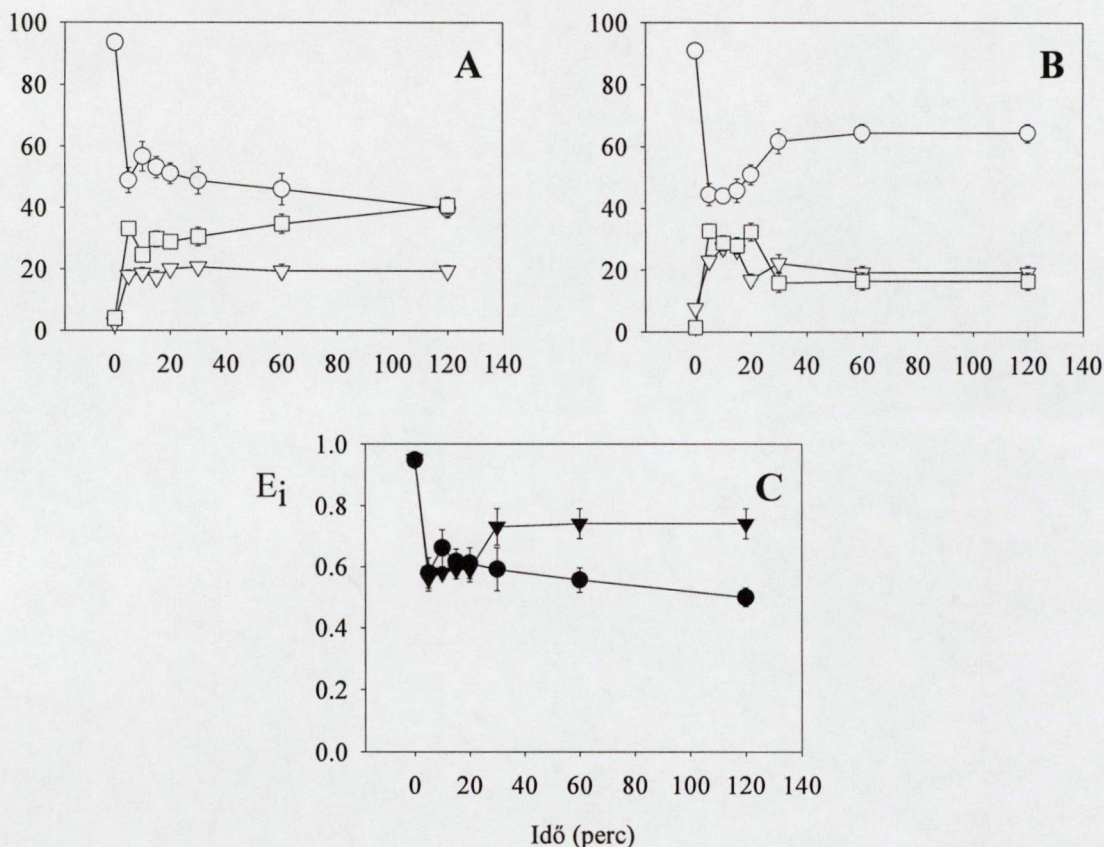
A kutatások kezdeti szakaszában a betyárkóró AS és AR biotípusa esetében tanulmányoztuk a xantofill-ciklus fényindukciójának kezdeti kinetikáját is. Ezeket a méréseket sötétadaptált intakt növények intenzív fénnel történt megvilágítása során különböző időpontokban kivágott levélkorong minták pigment analízisével végeztük (3.1.7. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy 30 perc elteltével mindkét biotípus levelében gyakorlatilag lezajlott a xantofill-ciklus fény indukálta de-epoxidációs átalakulása, amely azonban az AR biotípus esetében jóval visszafogottabb maradt ( $E_t=0.75$  az AS növény 0.59-es értékével szemben). A kezdeti 30 perces időszakban viszont, az AR biotípusban átmenetileg megfigyelhettünk egy nagyobb mérvű de-epoxidációt, amelyhez hasonló tranziens jelenséget az AS biotípusban nem lehetett észlelni. Aszkorbát hiányos *Arabidopsis* mutánsokban újabban az irodalomban a ZEA- függő NPQ csökkent fényindukcióját írták le (Smirnoff 2000, Müller-Moulé et al. 2002), s a jelenséget az aszkorbát hiánya által korlátozott VDE aktivitással értelmezték. Az NPQ hasonló fény indukálta tranziens felfutását és visszaesését Ivanov és Edwards (2000) egyértelműen az aszkorbát ellátás változásaira vezette vissza. Ennek oka a VDE és a Mehler peroxidáz reakció központi enzime, az aszkorbát peroxidáz között az

aszorbátért folyó kompetíció lehet (Neubauer & Yamamoto 1994). Tekintve, hogy az aszorbát alapvetően szükséges a xantofill-ciklus de-epoxidációs folyamataihoz, annak a lehetősége is fennáll, hogy az AR biotípusban a xantofill-ciklus visszafogott működésének oka esetleg a kloroplasztiszból kialakuló tartós aszorbát hiány.



**3.1.6. ábra** A xantofill ciklus (XC) működése a betyárcóró szenzitív (AS) és paraquat-atrazin korezisztens (PQAR) biotípusának leveleiben szabadföldi körülmények között. **A** és **C**: a xantofill-ciklus pigmentjeinek (VIO, -O-; ANT, -V-; ZEA, -□-) egymásba alakulása az AS (**A**) és PQAR (**C**) biotípusban. **B**: a xantofill-ciklus epoxidációs állapotának alakulása az AS (-●-) és PQAR (-▼-) biotípusban. **D**: a ZEA összes klorofilltartalomra vetített mennyiségének alakulása az AS (-●-) és PQAR (-▼-) biotípusban. A beszűrt diagram ablakban (**E**) a mintavételkor mért fotszintetikusan aktív beeső fény (PAR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foton) A kémiai analitikai mérési adatpontok 8 ismételtes átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.





**3.1.7. ábra** A xantofill-ciklus pigmentjeinek (VIO, -O-; ANT, -V- ; ZEA, -□-) fény indukálta egymásba alakulása a betyárkóró szenzitív (AS, **A**) és AR (AR, **B**) biotípusának intakt növényen lévő leveleiben  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson és az ebből számítható epoxidációs index ( $E_i$ ) az AS (-●-) és AR (-▼-) növény levelében (**C**). A mérési adatpontok 8 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.

Felmerült a kérdés, vajon a betyárkóró AR biotípusánál tapasztalt visszafogott ZEA képződés általánosan megfigyelhető-e más gyomfajok AR biotípusában. Ennek a kérdésnek a megválaszolása céljából hasonló HPLC-s karotinoid méréseket végeztünk a fehér libatop, a füziké, a közönséges aggófű, a fekete csucor, a szőrös disznóparéj kétszikű fajok AR biotípusaival. Ezekben a fajokban előforduló atrazin-rezisztencia egyöntetűen a D1 protein ugyanazon pontmutációjával hozható összefüggésbe (Gressel 1985, Hirschberg & McIntosh 1983). A fényintenzitás függés vizsgálatához 1 óras megvilágítást követően rögzítettük a mintákat cseppfolyós nitrogénben, mert irodalmi adatok alapján és a betyárkóró esetén itt bemutatott tipikus kísérleti eredmények szerint (3.1.6. ábra) a xantofill-ciklus egy adott fényintenzitáson már 30 perc elteltével is biztosan egyensúlyi állapotba jut. A nagyszámú mérés kellő ismétlésszámban történő

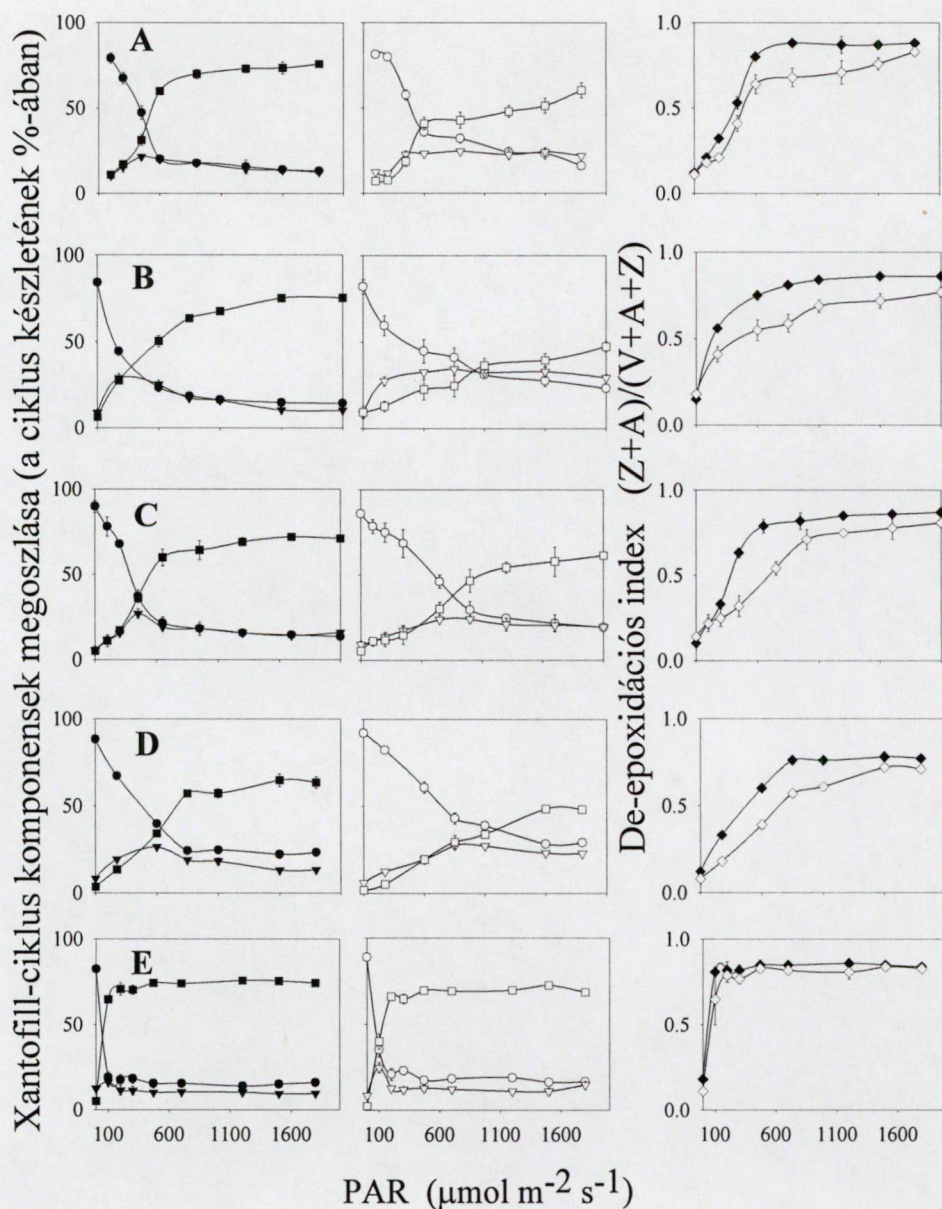
elvégezhetősége és a jobb reprodukálhatóság érdekében a továbbiakban intakt levelek helyett kivágott és csapvízen úsztatott levélkorongokkal dolgoztunk, úgy ahogy a szakirodalomban is elfogadott, és gyakran alkalmazott.

A vizsgált kétszikű gyomokban a xantofill-ciklus fény indukálta átalakulását (3.1.8. ábra) egyrészt a ciklus komponenseinek százalékos megoszlása (baloldalt és középen), másrészt a számított de-epoxidációs állapot (jobbaldalt) segítségével jellemeztük. Az összes kétszikű AR biotípusban egyöntetűen megfigyelhető a VIO de-epoxidáció mintegy 10-30%-ban csökkent mértéke az AS biotípushoz képest, amelyet a de-epoxidációs állapot alakulása is egyértelműen mutat. Erős fényintenzitásokon általában az AS biotípusokban a ciklus készletének több mint 50%-a, míg az AR biotípusokban kevesebb mint 50%-a volt ZEA-ként megtalálható. Ez jó összhangban áll a betyárkóró esetében *in vivo* körülmények között megfigyelt képpel. Érdekes megfigyelnünk azonban, hogy az *in vitro* levélkorongos mérésekben általában véve nagyobb mérvű ZEA képződést kaptunk, amelynek szélsőséges esetét a C4-es kétszikű *A. retroflexus* levélkorongjaiban figyelhattuk meg. Ennek magyarázatát – a szakirodalomban újabban megjelent közleménnyel (Kato et al. 2002) összhangban – abban látjuk, hogy az úsztatott levélkorongos rendszerben a lassúbb diffúzió következtében súlyos mérvű CO<sub>2</sub> hiány alakulhat ki a kloroplasztiszbán, amely az elnyelt fény fotokémiai hasznosulását extrém mértékben rontja, szélsőségesen előtérbe hozva a nem-fotokémiai kioltási folyamatokat.

A 3.1.2. táblázat tartalmazza a tanulmányozott kétszikű gyomok AS és AR biotípusának leveleiben a fotoszintetikus pigmentek összetételének adatait. Nincsenek világosan kivehető tendenciák az összes pigment tartalmakban, mindössze az AR biotípusok viszonylag alacsonyabb klorofill *a/b* aránya figyelhető meg egyértelműen. Habár a xantofill-ciklus készletének mérete – különösen az összes klorofilltartalomra vetítve – az egyes növényfajok között jelentős eltéréseket mutatott, nem figyelhattunk meg szinifikáns és szisztematikus különbségeket az egyes fajok két biotípusa között. Jóllehet, a klorofill *a/b* arány jelez egyfajta árnyéklevél karaktert az AR biotípus esetében, a xantofill-ciklus készletének méretéről ez nem mondható el. Mindkét biotípus egyöntetűen képes a nevelési

fényviszonyokhoz akklimatizálódni, vagyis gyenge megvilágítás mellett lényegesen kisebb xantofill-ciklus készletet felhalmozni (Váradi et al. 1994a, Polyánka et al. 2002). Másfelől, nem mutathatunk ki egy esetleges kompenzációs effektust sem az AR biotípusban, amely a ZEA koncentrációt a csökkent de-epoxidációs aktivitás mellett





**3.1.8. ábra** A xantofill-ciklus komponenseinek egymásba alakulása (baloldalt és középen; VIO,  $\circ$ ; ANT,  $\nabla$ ; ZEA,  $\square$ ) és a belőlük számított de-epoxidációs index  $((Z+A)/(VIO+ANT+ZEA))$ , jobboldalt) fényintenzitás függése a *Chenopodium album* (A), az *Epilobium adenocaulon* (B), a *Senecio vulgaris* (C), a *Solanum nigrum* (D) és az *Amaranthus retroflexus* (E) AR (AR, üres szimbólumok) és szenzitív (AS, teli szimbólumok) biotípusának leveleiben. Hasonló adatokat az *Erigeron canadensis* esetében a Váradi et al (1994) és a Darkó et al. (2000) dolgozatokban találunk. Az adatok 3 független kísérletből származó 15 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.

nagyobb méretű xantofill-ciklus készlettel igyekezne megfelelő értéken tartani. Közvetve kimutatható volt viszont a betyárkóró esetében (Darkó et al. 2000) olyan



típusú kompenzációs hatás, amely a D1 protein fokozott turnover-ében nyilvánul meg, s ezáltal az átfogó fotoprotekciós rendszer egészét igyekszik megfelelő szinten tartani. Ugyanilyen jelenséget sikerült kimutatni az AR *Brassica napus* esetében (Sundby et al. 1993) és újabban olyan transzgenikus dohány növények szabadföldi vizsgálatában, amelyek csökkent VDE aktivitást mutattak (Sun et al. 2001). Meg kell jegyeznünk, hogy utóbbi szerzők kifejezetten csak a szabadföldi körülményekhez adaptálódott növényekben tapasztalták ezt a fajta kompenzációs hatást. Az AR biotípusok esetében ez a kompenzáció semmilyen

### 3.1.2. táblázat

A levelek fotoszintetikus pigment összetétele a *Chenopodium album*, az *Epilobium adenocaulon*, az *Erigeron canadensis*, a *Senecio vulgaris*, a *Solanum nigrum* és az *Amaranthus retroflexus* szenzitív (AS) és AR (AR) biotípusában (Chl, klorofill; V, VIO; A, ANT; Z, ZEA; n=4-5)

Növényfaj	Biotípus	Chl <i>a+b</i> ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	Chl <i>a/b</i> arány	Összes karotinoid ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	VIO+ANT +ZEA ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	(VIO+ANT+Z EA) per Chl <i>a+b</i> ( $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ )
<i>Chenopodium album</i>	AS	308±44	3.22±0.08	107±6	12.4±0.6	40.2±2.1
	AR	266±36	3.10±0.09	96±6	15.8±0.9	59.6±3.4
<i>Epilobium adenocaulon</i>	AS	316±37	2.98±0.05	113±9	29.0±1.1	91.8±3.8
	AR	282±35	2.83±0.05	109±5	25.7±1.3	91.1±4.8
<i>Erigeron canadensis</i>	AS	364±21	3.04±0.05	103±5	17.3±2.1	47.5±4.2
	AR	381±25	2.77±0.07	122±3	16.5±1.8	43.3±5.2
<i>Senecio vulgaris</i>	S	295±23	2.72±0.01	81±7	12.9±1.4	43.7±6.2
	AR	316±24	2.59±0.04	90±5	12.5±0.8	38.2±5.9
<i>Solanum nigrum</i>	AS	283±29	2.98±0.08	86±6	16.7±0.9	59.0±3.2
	AR	292±32	2.88±0.05	88±6	18.2±1.3	63.2±4.6
<i>Amaranthus retroflexus</i>	AS	236±15	3.75±0.05	73±5	18.6±1.9	78.8±6.1
	AR	266±11	3.50±0.05	81±5	16.7±2.1	62.8±7.8

körülmények között sem tűnik teljesnek, hiszen a PSII fokozott fényérzékenységét és fénygátlását mindenkor tapasztalhatjuk.

A xantofill-ciklus működésének további közvetlen tényezője a VIO de-epoxidációját két lépésben elvégző VDE enzim aktivitása. Ennek vizsgálata azt mutatta (Darkó et al. 2000, Várad

et al. 2003), hogy a vizsgált kétszikű gyomfajok AS és AR biotípusában azonos az *in vitro* körülmények között mérhető VDE aktivitás. Az *in vivo* VDE aktivitás különbség azonban nem zárható ki.

Az úsztatott levélkorongokban az *in vivo* mérésekhez (lásd Várad

et al. 1994a,b, Darkó et al. 1996) képest minden fényintenzitáson extrém mértékű de-epoxidációt észlelhattunk, amelyet a CO<sub>2</sub> asszimiláció nagymérvű gátoltságával értelmezhetünk. Másfelől azt is mondhatjuk, hogy erős fényintenzitásokon ilyen körülmények között viszont a VIO hozzáférhetőségéről kaphatunk képet. Ennek alapján kijelenthetjük, hogy a biotípusok között a VIO hozzáférhetőség tekintetében 1800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR mellett már minimálisra csökken a különbség (lásd a de-epoxidációs státuszt a 3.1.8. ábra jobboldali diagramjain). Ez nem zárja ki, hogy *in vivo* a VIO hozzáférhetőség korlátozottsága egyik közvetlen oka legyen a xantofill-ciklus csökkent aktivitásának az AR növényekben. A VIO hozzáférhetőség regulációját a szakirodalomban a plasztokinon készlet redukciós állapotával hozták összefüggésbe (Siefermann and Yamamoto 1975, 1974b), de a pontosabb mechanizmus nem ismert.

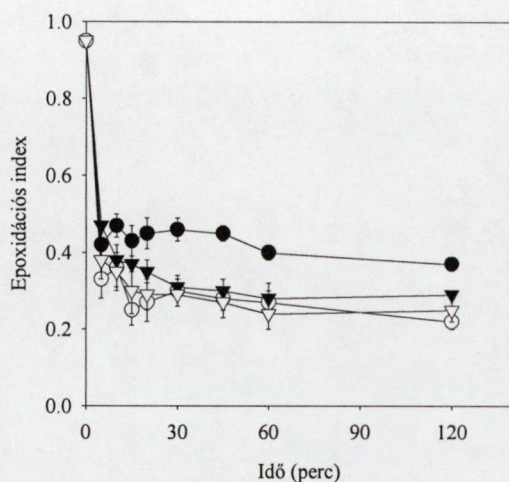
A pigment összetételben (3.1.2. táblázat) megfigyelhető egyetlen következetes eltérés a kisebb klorofill *a/b* arány volt az AR biotípusban. Ez eltolódást jelezhet a PSII/PSI arányban és/vagy – az árnyékhoz akklimatizálódott levelekhez hasonlóan, viszont nem árnyékos környezetben – egy szokásosnál nagyobb méretű antennát az AR növény esetében, mely utóbbi nagyobb gerjesztési energia fölösleget okozhat ezen D1 protein mutánsok fotoszintetikus apparátusában. Egy ilyen túlzott méretű fénybegyűjtő antenna a nem teljes értékűen funkcionáló xantofill-ciklussal együtt jól megmagyarázhatja az AR növények nagyobb fényérzékenységét.

A xantofill-ciklus működésében és az NPQ folyamatokban az AR biotípusban tapasztalható esetenként akár 30%-os hiány háttérében olyan további regulációs elemek játszhatnak szerepet, mint a transz-tilakoidális ΔpH nagysága és a PsbS fehérje PSII egységre vetített aránya (Li et al 2002a). Másfelől, a két biotípus megegyező PsbS protein szintje mellett sem zárható ki az AR biotípus esetében, hogy erős megvilágítás mellett csak kisebb ΔpH alakul ki a tilakoid membrán két oldala között, amely nem teszi

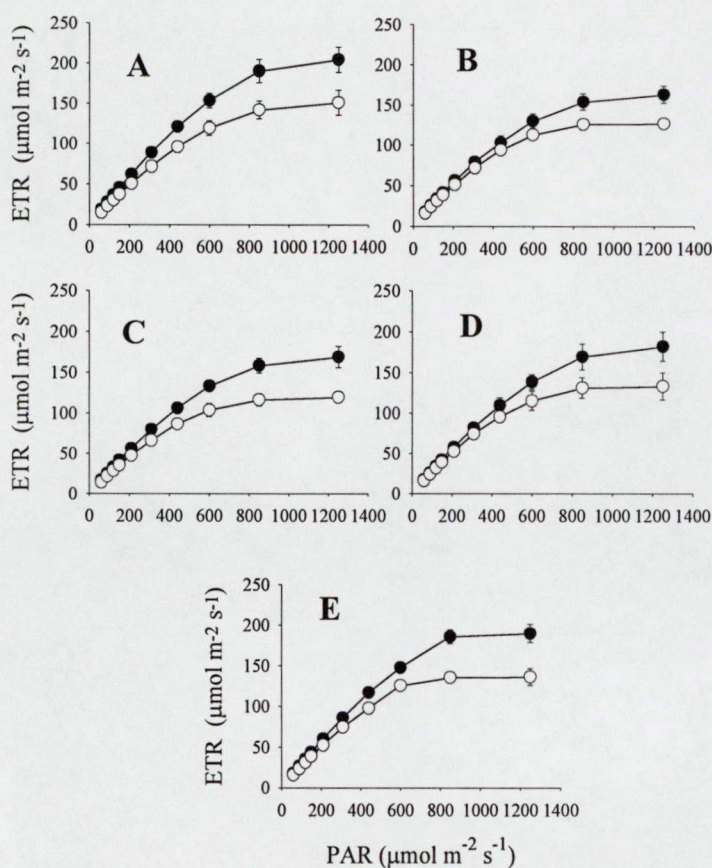
lehetővé PsbS kellő protonálódását, s gátolná a VDE működését. Hipotetikusán a *psbS* olyan pontmutációja is elképzelhető az AR növényben, amely a PsbS fehérje lumen oldali szakaszán lévő protonálható aminosav maradékokat érinti, amelyek kritikusak a megfelelő működés és a stabilitás szempontjából (Li et al 2002b). Kimutatták, hogy a PSII-ben végbemenő xantofill-ciklustól függő nem-radiatív energia disszipációt nem csak a lumen savanyodása, hanem az aszkorbát ellátás is befolyásolja (Neubauer & Yamamoto 1994). Feltételezik, hogy a kloroplasztisz lumenben kialakuló időleges aszkorbát hiány *in vivo* gátolhatja a VIO de-epoxidációt (Müller-Moulé et al. 2002). Ez a lehetőség valóban nem zárható ki az AR növények esetében.

A betyárkórú AS és AR biotípusának xantofill-ciklusa azonban intenzív fényen nagyon hasonló fényválaszt adott az erős elektron-akceptor metilviologén (paraquat) jelenlétében (Váradi et al. 1998a, Darkó et al. 2000, Váradi et al. 2000) (3.1.9. ábra) és ugyanez beigazolódott a fűzike esetében is (az adatok hely hiányában nincsenek bemutatva). Érdekes, hogy gyenge megvilágítás mellett paraquat jelenlétében az AR növény mutatott nagyobb mérvű de-epoxidációt. A fenti kísérleti megfigyelés két fontos dolgot jelez: (1) a maximális *in vivo* VDE aktivitás és a VIO hozzáférhetőség hasonlóvá válik a két biotípusban, amikor a lumen savanyodás természetes mechanizmusait egy erősen felgyorsított lineáris elektrontranszport és az ebből valószínűleg adódó extrém nagy transz-tilakoidális  $\Delta pH$  megzavarja, és (2) a relatív aszkorbát hiány talán mégsem lehet az oka a csekélyebb ZEA képződésnek az AR növényben, mert akkor a kezdeti szakaszban tapasztalnunk kellene a de-epoxidáció gátoltságát. Ily módon, jelenleg a lassúbb elektrontranszport következtében előálló csekélyebb mérvű lumensavanyodásnak tulajdonítható kisebb VDE aktivitás marad egy lehetséges magyarázat a megváltozott xantofill-ciklus működés és NPQ folyamat, valamint a nagyobb fényérzékenység kétszikű AR növényekben megfigyelhető jelenségére. Ennek hátterében a PsbS protein és/vagy a VDE protonálódásának megváltozása állhat. A rendelkezésünkre álló ismeretanyag alapján nem tudjuk megmondani, vajon egy újabb modell szerinti delokalizált proton gradiens kiépülésének mértékében lehet-e különbség a biotípusok között az AR biotípus rovására. Az a tény, hogy a Pq kezelések során nem kaptunk különbséget az AR és a vad biotípus között (3.1.9. ábra), a pH-viszonyok *in vivo* alakulásában meglévő különbséget sejtet. Ezt látszik igazolni a lineáris elektrontranszport sebességre a fotoszintetikus kvantumhasznosításból Genty et al. (1989) szerint kiszámított értékek szignifikánsan kisebb értéke az AR biotípusban (3.1.10. ábra).





**3.1.9. ábra** A paraquat-kezelés hatása a betyárkóró szenzitív (AS, körök) és AR (AR, háromszögek) biotípusának intakt leveleiben működő xantofill-ciklus epoxidációs indexére gyenge ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , teli jelölő karakterek) és intenzív ( $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , üres jelölő karakterek) fénnel történő megvilágítás mellett. Az adatok 5 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.



**3.1.10. ábra** A fotoszintetikus elektrontranszport számított sebessége a fehér libatop (A), a betyárkóró (B), a füziké (C), a közönséges aggófű (D) és a fekete csucsor (E) atrazin-rezisztens (AR, üres szimbólumok) és szenzitív (AS, teli szimbólumok) biotípusának leveleiben. A méréseket az egyes fényintenzitásokon 5 perc beállási idő után végeztük. Az adatok 15 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.

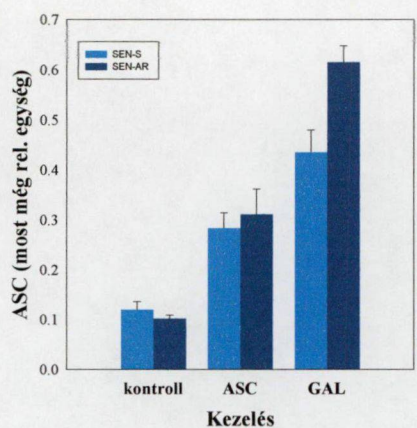
A lehetséges magyarázatok közül nem zárhatjuk ki a ZEA epoxidációs folyamat esetleges nagyobb sebességét a D1 mutáns biotípusban. Ennek ellentmond, hogy az intakt, kezeletlen levélen intenzív megvilágítást követően, sötétben tapasztalt xantofill-ciklus lecsengési kinetikák között nem volt szembetűnő eltérés (Váradi et al. 1995). A legújabb irodalmi adatok alapján felmerülhet az a kérdés is, hogy az AR biotípusok xantofill-ciklusának rendellenes működését a tilakoid membránok fluiditásbeli eltérései okozhatják. Korábbi mérések szerint a betyárkóró AR biotípusának tilakoid membránjában nagyobb az MGDG és a telítetlen zsírsavak aránya, ami fokozottabb membrán fluiditást eredményez. Ennek a VIO hozzáférhetőség fokozódásában kellene megnyilvánulnia, amelyet normál körülmények között sajnos nem tapasztalhattunk. Feltevésem szerint ez azzal magyarázható, hogy ezzel ellentétesen ható más jelenségek, mint például a pH-viszonyok kedvezőtlen alakulása az AR biotípusban ezt a hatást túlkompenzálhatják. Az sem kizárt, hogy az általam nem vizsgált kritikus MGDG:VIO aránynak (Yamamoto et al. 1974) az AR biotípusban az optimálistól való jelentős eltérése okozza az ellentmondást.

#### **3.1.4. Az aszkorbát szerepének vizsgálata**

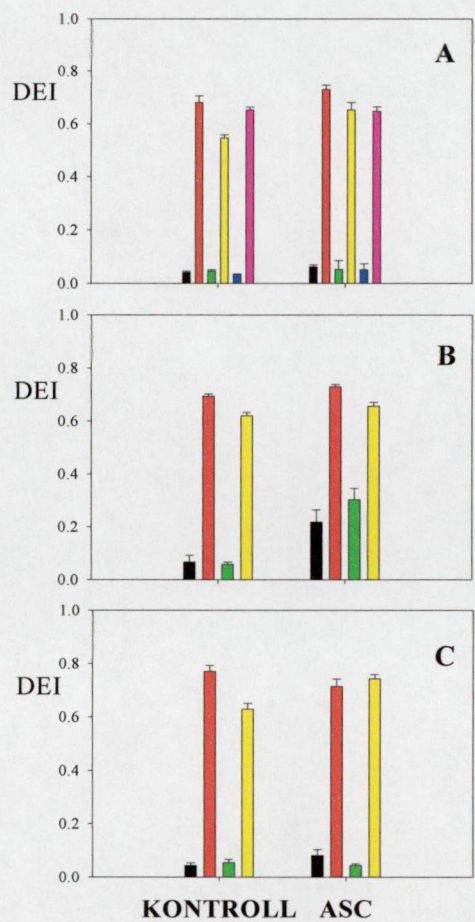
Annak felderítésére, hogy egy relatív aszkorbát hiány okozhatja-e a csökkent VIO de-epoxidációt az AR biotípusokban, néhány gyomfajjal aszkorbát beviteli kísérleteket folytattunk. Ennek során kétféle ismert eljárást alkalmaztunk: a levélnyélen át, sötétben 16 órán át tartó (1) L-aszkorbinsav és (2) L-galaktonsav-1,4-lakton fölvételt. Utóbbi vegyület az aszkorbát közvetlen prekursora, s a mitokondriumban a belső membránhoz kötött galaktolakton dehidrogenáz (GalLDH) végzi átalakítását (Siendones et al. 1999). A kétféle módszerrel alapján véve megegyező eredményekre jutottunk, legfeljebb az effektus nagyságában mutatkozott esetenként eltérés. Hely hiányában a fluoreszcencia kioltási paraméterek tekintetében itt csak az aszkorbát adagolással kapott eredményeket mutatjuk be.

A kezeletlen és az inkubált levelek mérhető aszkorbát tartalmát (helytakarékoság miatt csak a közönséges aggófű adatait mutatjuk be, a másik két faj esetében hasonló tendenciát tapasztaltunk, 3.1.11. ábra) és a xantofill-ciklus működésében aszkorbát adagolás hatására bekövetkezett változásokat (3.1.12. ábra) oszlopdiagramokon mutatjuk be. A vizsgált gyomfajok AR biotípusának levelében valamelyest kisebb aszkorbát koncentrációt találtunk a vad biotípushoz képest (3.1.11. ábra). Ez a csekély különbség önmagában kevésnek tűnik a xantofill-ciklus csökkent de-epoxidációs





**3.1.11. ábra** A mérhető aszkorbát koncentráció alakulása excizált és levélnyélen át csapvízzel (kontroll), aszkorbát-oldattal (ASC) és L-galaktonsav-1,4-lakton oldattal (GAL) inkubált fehér libatop levelekben (szenzitív (vad) biotípus: világoskék, atrazin-rezisztens biotípus: sötétkék). Az ismétlések száma .. volt és feltüntettük az átlagok standard szórását.



**3.1.12. ábra** Aszkorbát adagolás hatása a xantofill-ciklus működésére (de-epoxidációs index,  $DEI = (ANT + ZEA) / (VIO + ANT + ZEA)$ ) a betyárkóró (A), a közönséges aggófű (B) és a fekete csucor (C) atrazin-szenzitív (fekete és piros oszlopok) és atrazin-rezisztens (zöld és sárga oszlopok) leveleiben sötétben (fekete és zöld oszlopok) és  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR mellett (piros és sárga oszlopok). Az *E. canadensis* (A) esetében atrazin-rezisztens növényként a paraquat-atrazin rezisztens biotípust vizsgáltuk és mellette a paraquat-rezisztens biotípussal kapott eredményeket is feltüntettük (kék és lila oszlopok). Az adatok 6 ismétlés átlagai.



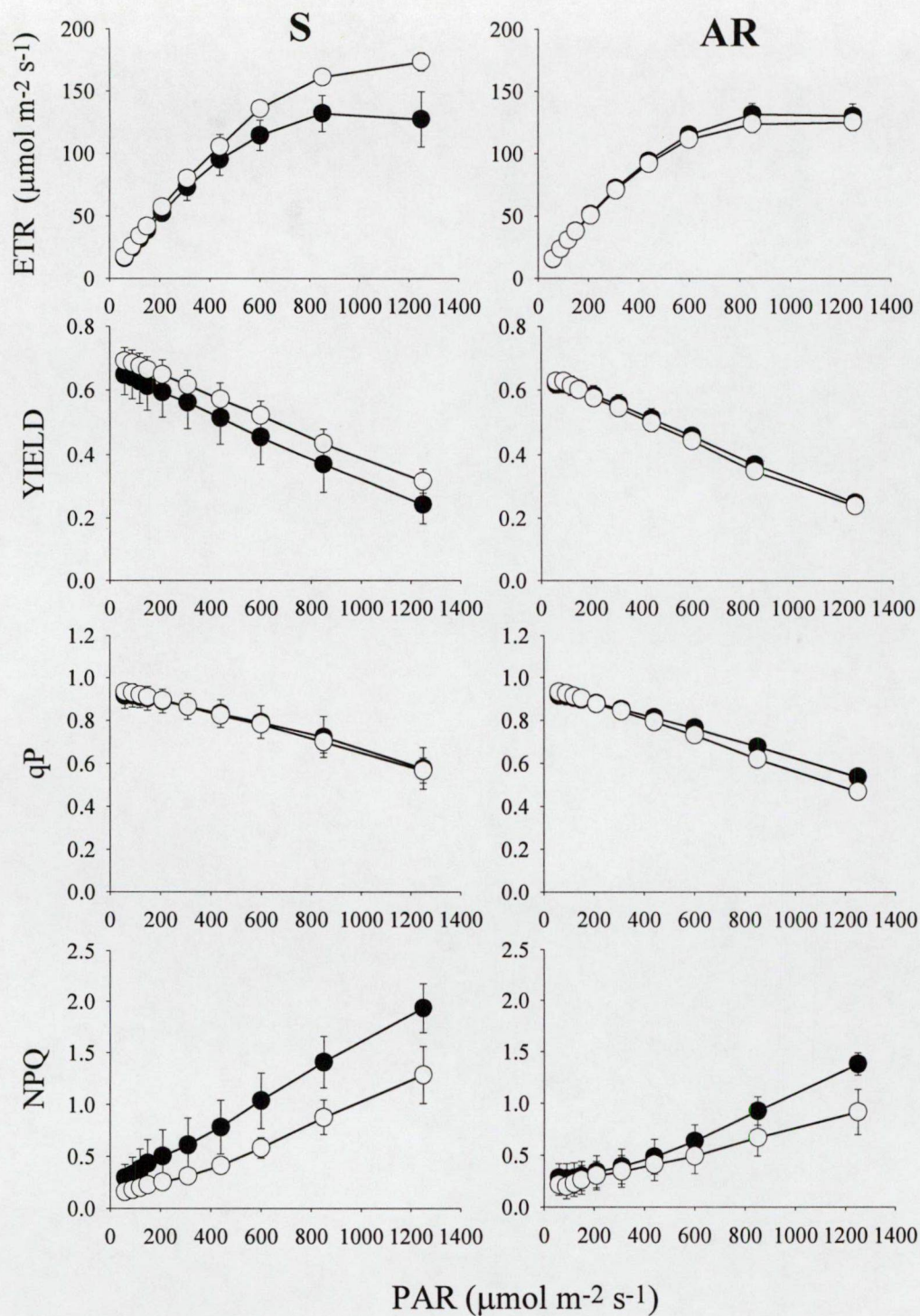
aktivitásában a biotípusok között meglévő jelentős eltérés (3.1.12. ábra, kontroll) magyarázatára. Ugyanakkor azt sem szabad elfelejtenünk, hogy ezek a mérések semmit sem árulnak el a tilakoid lumenben ténylegesen kialakuló aszkorbát koncentrációról. Erre vonatkozóan csak becslésekre hagyatkozhatunk, s nem tisztázott az aszkorbát lumenbe irányuló transzportjának mechanizmusa sem. Tény, hogy az aszkorbáttal vagy L-galaktonsav-1,4-laktonnal történt 16 órás inkubálás során az excizált

levelekbe az eredeti aszkorbát többszöröse jutott be, vagy keletkezett a mitokondriumban (3.1.11. ábra, ASC és GAL). Az is tagadhatatlan, hogy az AR növények esetében többnyire

megfigyelhető a xantofill-ciklus de-epoxidációs indexének növekedése, míg a szenzitív biotípusokban kevésbé, vagy egyáltalán nem, esetleg épp ellenkező hatás mutatkozik (3.1.12. ábra, piros, sárga és lila oszlopok). Sőt, egyes növényfajok esetében (pl. fekete csucsor) a sötétben tartott növényekben is fokozódott a xantofill-ciklus de-epoxidációs foka (3.1.12. ábra, fekete, zöld és kék oszlopok), amelynek egy fénytől független, egyidejűleg bekövetkező lumen savanyodás állhat a hátterében.

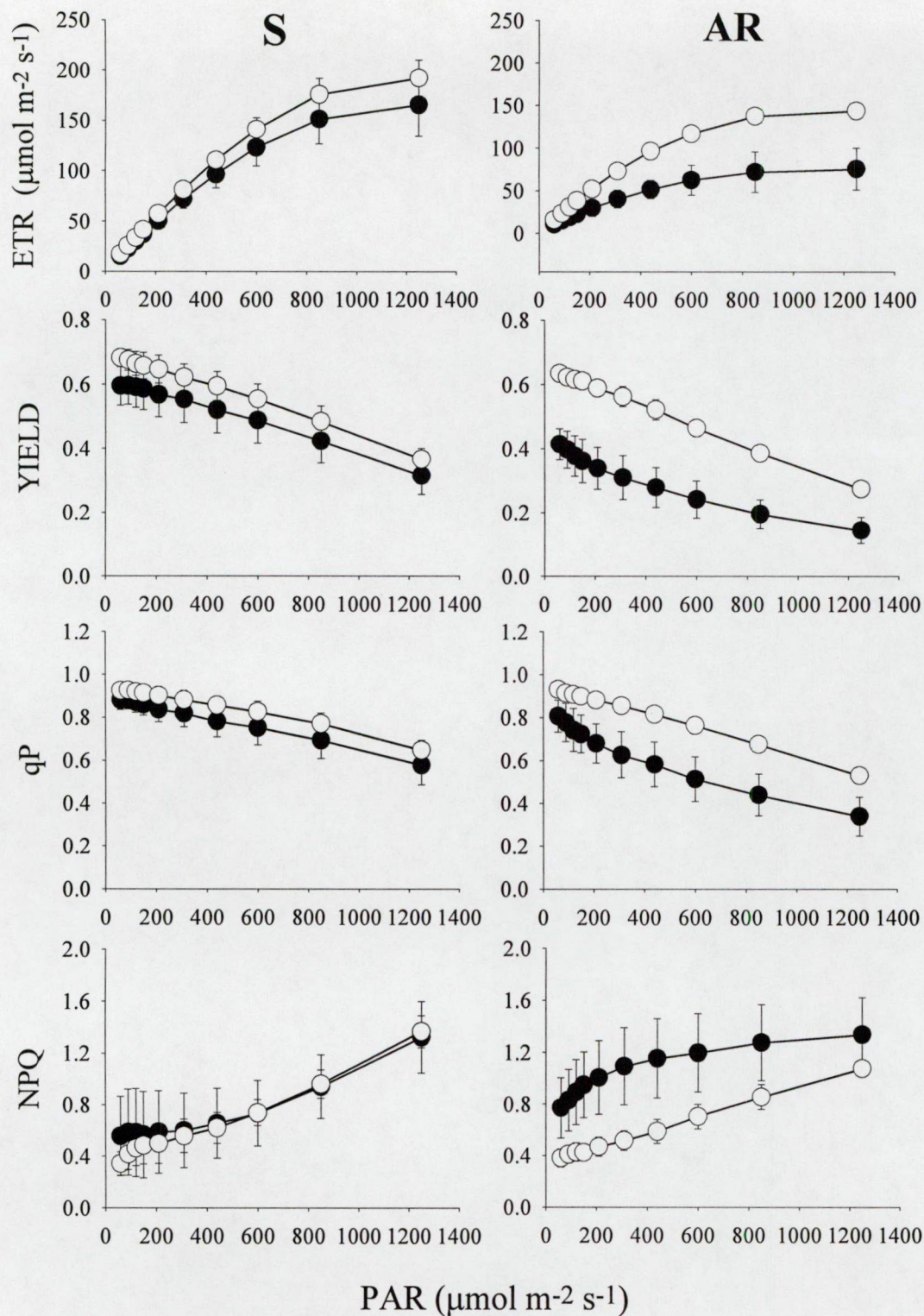
A fluoreszcencia kioltási paraméterek vizsgálata további – növényfajtól függő – változatosságot vitt a fent kialakult képbe. Így például a betyárkóró esetében (3.1.13. ábra) a PSII kvantumhatásfokában meglévő szinte konstans eltérés – amelyből egy erősödő fényre fokozódó lemaradás figyelhető meg a számított lineáris elektrontranszport sebességben – aszkorbát adagolást követően gyakorlatilag eltűnik. Érdekes azonban, hogy ez a szenzitív biotípus leromlásából fakad. A qP esetében az alkalmazott mérési körülmények mellett szokatlan módon nem volt kimutatható különbség, míg az NPQ esetében a kezeletlen kontroll növények esetében megnyilvánuló jól ismert, markáns eltérés aszkorbát hatására inkább fokozódott, mert az AR növényben csak egy kisebb stimuláló hatás mutatkozott a szenzitívhez képest. Igaz, az AR növény az aszkorbát kezelés hatására a kezeletlen szenzitív növényhez hasonló NPQ értékeket adott. Az aggófű esetében (3.1.14. ábra) a PSII hatásfok, az elektrontranszport sebesség és a qP egyaránt csökkent az aszkorbát bevitel hatására, de az AR növények esetében ez jóval kifejezettebb volt. Érdekes módon, az NPQ-ra a szenzitív növényben az aszkorbát adagolás hatástalannak bizonyult, míg az AR biotípusban jelentős stimulálódást figyelhattunk meg, s ez megint csak kiegyenlítette a biotípusok közötti eltérést.





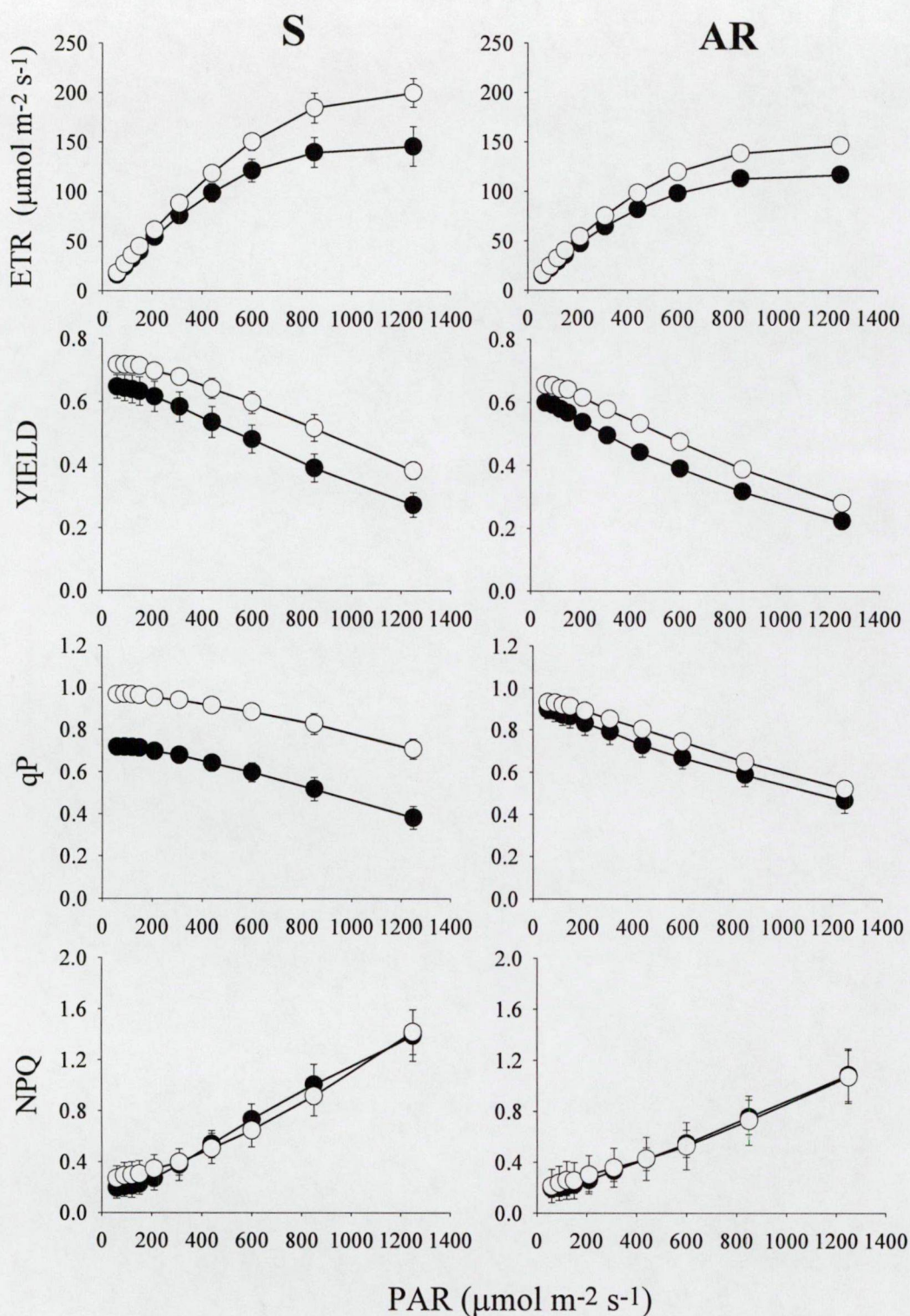
**3.1.13. ábra** Aszkorbát adagolás hatása a betyárkóró klorofil *a* fluoreszcencia kioltási paramétereire. Közepes fényintenzitáson nevelt növények excizált levelei által levélnyélen át 10 mM L-aszkorbinsav (ASC) oldatból 16 óra alatt sötétben fölvevett aszkorbát hatása az atrazin-szenzitív (baloldali diagramok) és atrazin rezisztens (jobboldali diagramok) biotípusra (ASC, teli körök; csapvizes kontroll, üres körök). Az adatok 8 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.





**3.1.14. ábra** Aszkorbát adagolás hatása a közönséges aggófű klorofill *a* fluoreszcencia kioltási paramétereire. Közepes fényintenzitáson nevelt növények excizált levelei által levélnyélén át 10 mM L-aszkorbinsav (ASC) oldatból 16 óra alatt sötétben fölvevett aszkorbát hatása az atrazin-szenzitív (baloldali diagramok) és atrazin rezisztens (jobboldali diagramok) biotípusra (ASC, teli körök; csapvizet kontroll, üres körök). Az adatok 8 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.





**3.1.15. ábra** Aszkorbát adagolás hatása a fekete csucor klorofill *a* fluoreszcencia kioltási paramétereire. Közepes fényintenzitáson nevelt növények excizált levelei által levélnyélén át 10 mM L-aszkorbinsav (ASC) oldatból 16 óra alatt sötétben fölvevett aszkorbát hatása az atrazin-szenzitiv (baloldali diagramok) és atrazin rezisztens (jobboldali diagramok) biotípusra (ASC, teli körök; csapvizes kontroll, üres körök). Az adatok 8 ismétlés átlagai. A szórások láthatóak, amennyiben nagyobbak a jelölő szimbólumoknál.

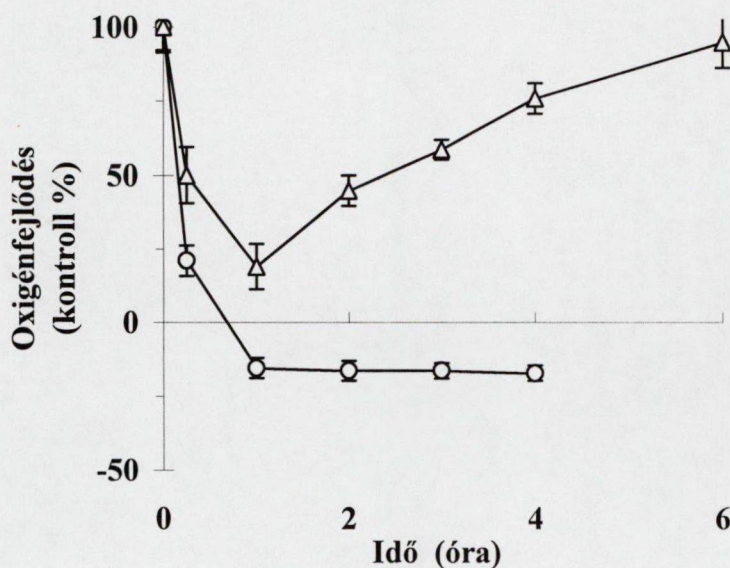
A fekete csucor (3.1.15. ábra) a PSII hatásfok, az elektrontranszport sebesség és a qP tekintetében az aszkorbát bevitt követően szintén egyöntetű csökkenést mutatott, de ez esetben – az aggófüvel ellentétben – a kezelés a szenzitív anyagot érintette súlyosabban. Meglepő módon, az NPQ a csucor egyik biotípusában sem reagált az aszkorbát bevitelre.



## 3.2. A paraquat hatásának vizsgálata betyárkórón

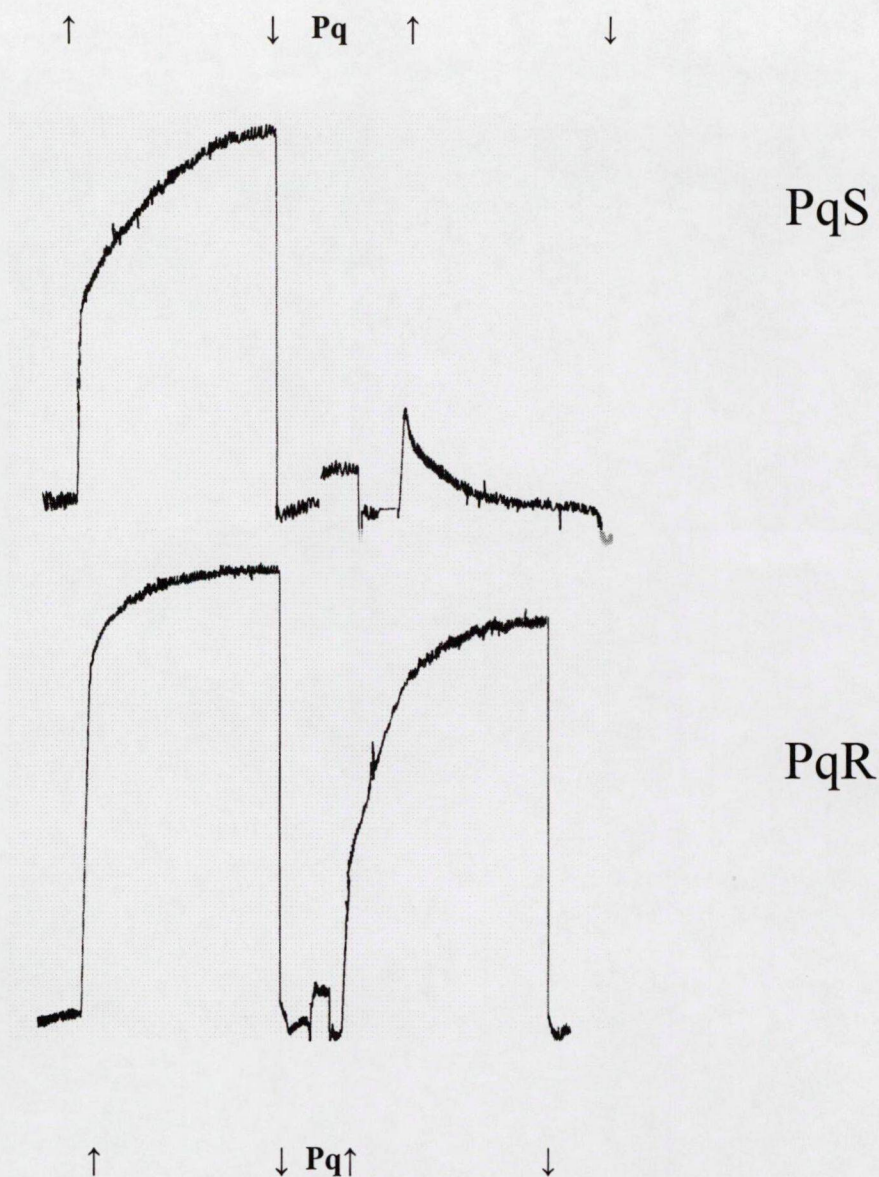
### 3.2.1. Fotoszintetikus folyamatok kezdeti gátlása a Pq-kezelt rezisztens biotípusban

A paraquat fotoszintetikus funkciókra gyakorolt hatását egyrészt levélkorongokon végzett  $O_2$ -fejlődés mérésekkel (3.2.1. ábra) másrészt intakt növények levelein történő  $CO_2$ -fixálás mérések eredményeivel (3.2.2. ábra) harmadrészt pedig intakt növények levelein megfigyelt fluoreszcencia indukciós paraméterek segítségével (3.2.3. ábra) mutatjuk be. A levélkorongokon 0.5mM paraquat (a gyomirtási gyakorlatban szokásos koncentráció) és  $850 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  PAR megvilágítás alkalmazása mellett mért nettó  $O_2$ -fejlődés időbeli lefutását a betyárkóró PqS és PqR biotípusa esetében a 3.2.1. ábrán mutatjuk be. A gyomirtási gyakorlatban is alkalmazott töménységű paraquat mindkét



**3.2.1. ábra** A nettó fotoszintetikus  $O_2$ -fejlődés időbeli alakulása a betyárkóró paraquat-rezisztens (PqR, Δ) és szenzitív (PqS, O) biotípusainak levélkorongjaiban (a kezeletlen kontroll %-ában) 0.5 mM paraquat jelenlétében  $850 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  fotoszintetikusán aktív fényvel megvilágítva. A PqS és PqR biotípusok kezeletlen kontrolljai esetében rendre  $53 \pm 6$  és  $55 \pm 5 \mu mol O_2 mg^{-1} klorofill h^{-1}$   $O_2$ -fejlődést tapasztaltunk ezen a fényintenzitáson. A paraquat-kezelést gyenge megvilágítás ( $15 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felülete megszikkadjon. Az  $O_2$ -fejlődést egy levélkorong elektród rendszerrel mértük, és az  $O_2$ -fejlődést a sötétlégzéssel korrigálva számítottuk ki a fényfüggő  $O_2$ -fejlődést, vagy  $O_2$ -fogyasztást. Az adatok 6 ismétlés átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).





**3.2.2. ábra** A paraquat  $\text{CO}_2$ -asszimilációs rátára (A) gyakorolt hatásának kezdeti (60 perces) kinetikája a betyárcsókó szenzitív (PqS, fent) és paraquat-rezisztens (PqR, lent) biotípusainak intakt növényen lévő leveleiben (jellemző regisztrátumok bemutatása). A leveleket a mérőkamrában 10 percig sötétben tartottuk, majd 60 perccel 850  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan aktív fényvel megvilágítottuk (a nyílak a megvilágítás kezdetét  $\uparrow$  és végét  $\downarrow$  jelzik). A kezeletlen kontroll (balra) mérése után 10 percig sötétben folytattuk a mérést, majd a levelet a mérőkamrából kivéve 10 perccel 0.5 mM paraquat oldattal átitatott papírvattába csomagolva, alufóliával betakarva sötétben tartottuk (Pq). Ezután gyenge (15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fény mellett visszahelyeztük a mérőkamrába, ahol további 10 percig sötétben tartottuk, majd a kontroll méréshez hasonlóan 60 perccel megvilágítás mellett ( $\uparrow$  és  $\downarrow$  között) regisztráltuk a nettó  $\text{CO}_2$ -asszimilációt. A kontroll görbék telítési értékei a két biotípusban a 11.7 és 13.5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  közötti tartományba estek.

biotípusban gyorsan gátolta a nettó  $\text{O}_2$ -fejlődést. A PqS biotípus levélkorongjai azonban jóval kifejezettebb gátlást mutattak, és mintegy 1 óra elteltével már csak egy fényfüggő  $\text{O}_2$ -fogyasztást figyelhettünk meg (feltehetően a szuperoxid-képződési folyamat

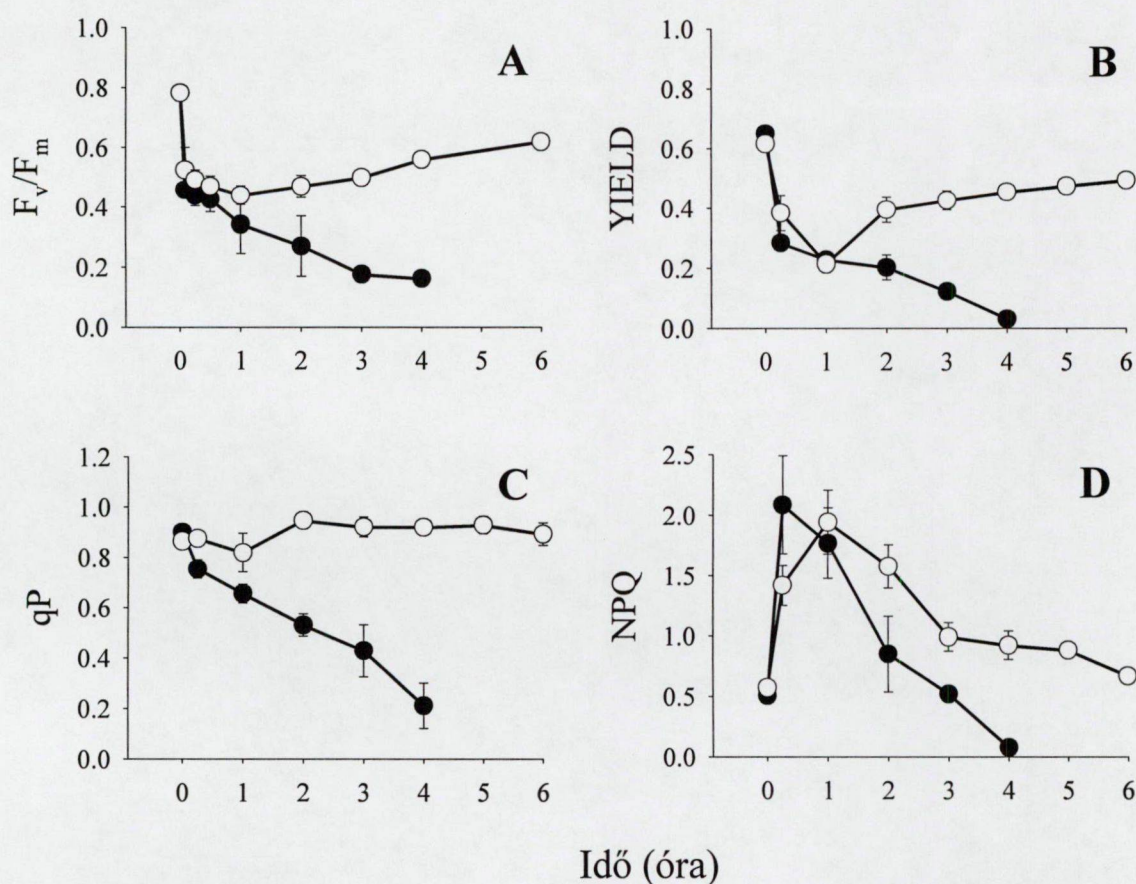
következtében). A PqR biotípus nettó O<sub>2</sub>-fejlesztési aktivitása – a PqAR biotípushoz hasonlóan (Lehoczki et al. 1992) – csak kevésbé gátlódott és 1 órás paraquat-hatást követően elkezdődött a funkció helyreállása.

A CO<sub>2</sub>-asszimilációt tekintve a korábbi izotópos CO<sub>2</sub>-fixációs mérések (Szigeti et al. 1988, Lehoczki et al. 1992) a fentihez hasonló tranziens gátlásról és helyreállásról tanúskodnak a PqAR biotípus esetében. Az akkor alkalmazott mérés technika nem engedett meg 30 percnél

finomabb felbontású méréssorozatok. Az infravörös gázelemzők elterjedésével azonban lehetőség nyílt arra, hogy a paraquat CO<sub>2</sub>-asszimilációra gyakorolt hatásának kezdeti kinetikáját is tanulmányozzuk. A 3.2.2. ábrán tipikus regisztrátumokat mutatunk be az *E. canadensis* PqS és PqR biotípusa esetében, intakt növények levelein végzett 60 perces időtartamú mérésekből. A kezeletlen kontroll felvételein megfigyelhető, hogy a PqR biotípus leveleiben a fotoszintetikus aktivitás gyorsabban elérte a steady-state szintet. A PqS biotípusban a paraquat fény jelenlétében percek alatt megszüntette a fotoszintetikus széndioxid asszimilációt és a kezelt levél 20 perc elteltével már nettó CO<sub>2</sub>-termelővé vált. Ennek egyaránt oka lehet a szenzitív növény kloroplasztiszában a NADPH elfogyása és/vagy kulcsenzimek (pl. a Rubisco) szuperoxid okozta gátlása. A rezisztens növény esetében is tapasztaltunk kezdetben egy jelentősebb visszaesést, amely a 60. percre azonban jelentősen mérséklődött. Ez újabb bizonyíték egyrészt arra, hogy a paraquat bejut a rezisztens növény kloroplasztiszaiba, másrészt arra, hogy nagyon gyorsan elindulnak a károsító hatás kivédését szolgáló, eddig jobbra ismeretlen folyamatok. A paraquat-kezelés első 2 órájában – a betyárkóró PqAR biotípusához hasonlóan (Lehoczki et al. 1992) – az  $F_v/F_m$  optimális kvantumhatásfok értékekben (3.2.3.A ábra) a PqR biotípusban is megfigyelhettünk egy tranziens visszaesést. A szenzitív növényben ez a paraméter 4 óra elteltével megközelítette a zérus értéket, míg a rezisztens növényben a 4-6 órás időszakban már a helyreállítás határozott jeleit láthattuk. A PSII relatív kvantumhatásfoka ( $\Delta F/F'_m$ , 3.2.3.B ábra) menetében hasonló tendenciát figyelhettünk meg, de talán még kifejezettebben. A két biotípus közötti különbséget a legélesebben a fotokémiai kioltási együttható ( $qP$ , 3.2.3.C ábra) jelezte, amely a rezisztens biotípusban csak csekély átmeneti visszaesést mutatott, míg a szenzitív esetében egy igen drasztikus leromlást jelzett. Az eddig áttekintett három fluoreszcencia paraméter tehát a paraquat okozta tranziens gátlásról alkotott eddigi képünkbe illően alakult, az ahhoz kapcsolódó következtetéseknek további megerősítést adva. Igazán újat és meglepőt az itt bemutatott negyedik paraméter, a nem- fotokémiai fluoreszcencia



kioltás (NPQ, 3.2.3.D ábra) időbeli alakulása hozott. Mint látható, a paraquat-kezelt szenzitív és rezisztens növényben az első órában fénykezelésnek megfelelően alakult az NPQ, bár a szenzitív növényben 1 óra után már láthatunk egy abnormális visszaesést, amely további monoton csökkenés után, 4 óra elteltével zérus értéket vesz fel. Meglepetésünkre az NPQ folyamat a rezisztens növényben paraquat és fény jelenlétében még 6 óra elteltével sem mutat helyreállást (a megfelelő kezeletlen kontroll NPQ értéke 2.5 körüli, szemben a paraquat kezelésnél 4 óra elteltével tapasztalt

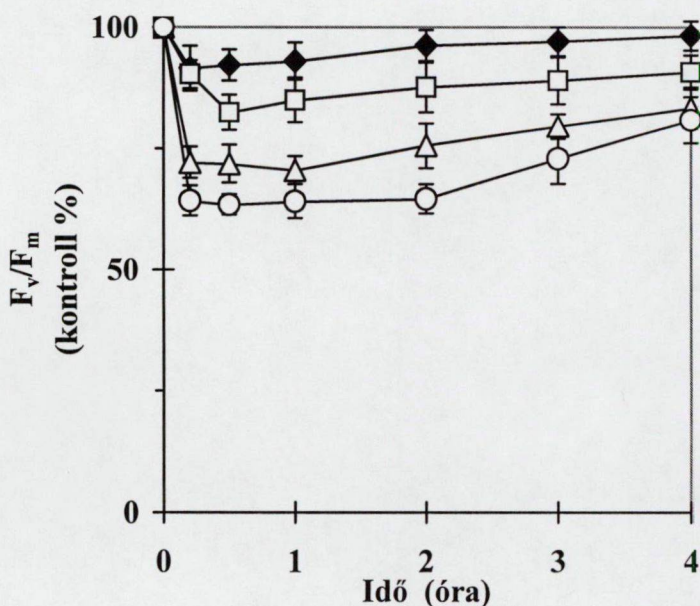


**3.2.3. ábra** Klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek időbeli alakulása az *Erigeron canadensis* paraquat-rezisztens (PqR, üres szimbólumok) és szenzitív (PqS, teli szimbólumok) biotípusainak intakt, a növényen lévő leveleiben 0.5 mM paraquat jelenlétében, intenzív megvilágítás ( $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett. A paraquat-kezelést gyenge megvilágítás ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felületén a Pq-oldat megszikkadjon. A fluoreszcencia indukciós kinetikát 10 perc sötétadaptációt követően regisztrálva meghatároztuk a PSII fotokémiai folyamatainak maximális kvantumhatásfokát ( $F_v/F_m$ ) (A), majd ezt követően 10 perces folytonos aktinikus megvilágítás ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett 1 percenként alkalmazott telítési fényimpulzusok ( $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) segítségével a végső szakaszban meghatároztuk a PSII elektrontranszport relatív kvantumhatásfokát ( $\Delta F/F'_m$ ) (B), a fotokémiai kioltási koefficiens (qp) értékét (C) és a nem-fotokémiai kioltás (NPQ) nagyságát (D). Az adatok 5 ismételts átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).



0.9-es értékkel). Ezzel együtt, a PqR és PqAR biotípus esetében Pq jelenlétében a fotoszintetikus  $O_2$ -termelésről,  $CO_2$ -asszimilációról, xantofill-ciklusról és NPQ (qE) folyamatról itt bemutatott eredmények minden eddigénél meggyőzőbben bizonyítják, hogy a Pq a rezisztens biotípus kloroplasztiszában is eljut hatóhelyére.

A következőkben a PqR biotípus intakt növényen lévő leveleiben 0.1mM paraquat jelenlétében megvizsgáltuk az  $F_v/F_m$  paraméter fényintenzitás függését (3.2.4. ábra). Az alkalmazott Pq-koncentrációt azért csökkentettük a gyomirtási gyakorlatban alkalmazott érték 1/5-ére, hogy a folyamatokat lassítva, alaposabban megfigyelhessük a finomabb



**3.2.4. ábra** A PSII maximális kvantumhatásfokában ( $F_v/F_m$ ) megfigyelhető fényintenzitás-függés az *Erigeron canadensis* paraquat-rezisztens (PqR) biotípusának intakt, a növényen lévő leveleiben, 0.1 mM paraquat jelenlétében. A paraquat-kezelést gyenge megvilágítás ( $15 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még a különféle fényintenzitással történő megvilágítás előtt a levelek felületén a Pq-oldat megszikkadjon. A fluoreszcencia indukciós kinetikákat további 10 perc sötétadaptációt követően rögzítettük. Jelölések: sötét kontroll, -◆-;  $100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , -□-;  $200 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , -Δ-;  $500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , -○-. Az adatok 8 ismételtes átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).

részleteket. Ennek során mérsékelt fényintenzitásokat ( $100$ ,  $200$  and  $500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) és sötétkezelést is alkalmaztunk. A sötétben a paraquat csekély mértékben hatott a PqR növény leveleiben mérhető  $F_v/F_m$  paraméterre, hasonlóan a korábban *E. canadensis* PqAR biotípusánál tapasztaltakhoz (Lehoczi et al. 1992). Eredményeink szerint a tranziens gátlás mélysége és a helyreállási folyamat látható beindulásának időpontja egyértelmű fényintenzitás függést mutat. Feltűnő, hogy már a közepes fényintenzitásnak számító  $200$  vagy  $500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  esetében az  $F_v/F_m$  paraméter nagyon gyorsan a

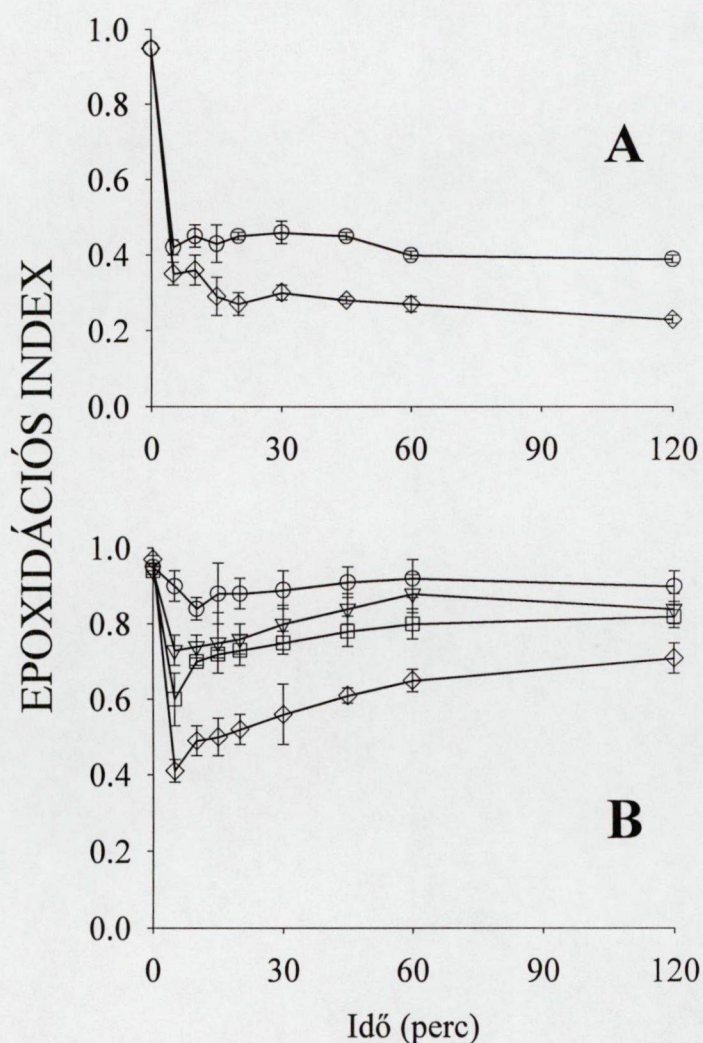
minimumra zuhan, jelezve, hogy a paraquat percek alatt elérte hatóhelyét a PqR növények kloroplasztiszaiban. Másik fontos megfigyelésünk, hogy minél nagyobb volt az alkalmazott fényintenzitás, annál tovább tartott a maximális gátlás, miközben a különböző fényen tartott paraquat-kezelt PqR növények ugyanazt a helyreállási szintet érték el 12 óra elteltével. Miután az eddigi eredmények alapján – a Váradí et al. (1990) és Lehoczki et al. (1992) által publikált megfigyelésekkel összhangban és azokat a PqR biotípus esetében megerősítve – még inkább úgy tűnt, hogy a fénynek kulcsszerepet kell játszania a paraquat-rezisztencia mechanizmusában, további kísérleteinket a fotoszintetikus apparátus fény által indukált járulékos folyamatainak, nevezetesen a xantofill-ciklus és a nem-fotokémiai kioltás alakulásának megismerésére irányítottuk.

### **3.2.2. A xantofill-ciklus és a nem-fotokémiai kioltás Pq jelenlétében**

A VIO megvilágítás hatására bekövetkező, ANT képződésen át ZEA felhalmozódáshoz vezető, a tilakoidokban bekövetkező de-epoxidációját az ún. epoxidációs index ( $E_i = (V + 0.5 \cdot A) / (VIO + ANT + ZEA)$ ) segítségével jellemezhetjük. A 3.2.5. ábrán az *E. canadensis* szenzitív (PqS, A) és paraquat-rezisztens (PqR, B) biotípusainak leveleiben 0.1 mM paraquat jelenlétében mért epoxidációs állapot időbeli lefutását tekinthetjük meg a PqS biotípus esetében 100 és 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , míg a PqR növényben 100, 200, 300 and 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitású megvilágítás mellett. A paraquat-kezelést követő fénykezelés első 5 percében mindkét biotípusban megfigyelhettük az epoxidációs index csökkenését (hasonlóan a kezeletlen sötétadaptált levelekben megvilágítás hatására bekövetkező változáshoz). A PqS biotípusban ez a paraquat + fény indukálta epoxidációs index csökkenés nem mutatott kifejezett fényintenzitás-függést. Ugyanakkor a PqR növényben egy tisztán kivehető fényintenzitás-függést figyelhettünk meg. Az azonban nem látszik egyértelműen, hogy a paraquat okozta hatás fényintenzitás-függése vajon a paraquat jelenlétében mérhető elektrontranszport sebesség fényintenzitás-függésének, vagy pedig netán egy speciálisan a PqR biotípus kloroplasztiszaiban előforduló, fényintenzitás-függő paraquat felvételnek a következménye. A paraquat-kezelt PqS növények esetében a két eltérő fényintenzitáson mért epoxidációs index első 5 percben bekövetkező csökkenésének mértékében alig volt különbség, s a 20. percig a nagyobb fényintenzitáson még kissé fokozódó esés által sem alakul ki olyan mérvű különbség, amelyet a megvilágításbeli különbség (100 és 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alapján várnánk.



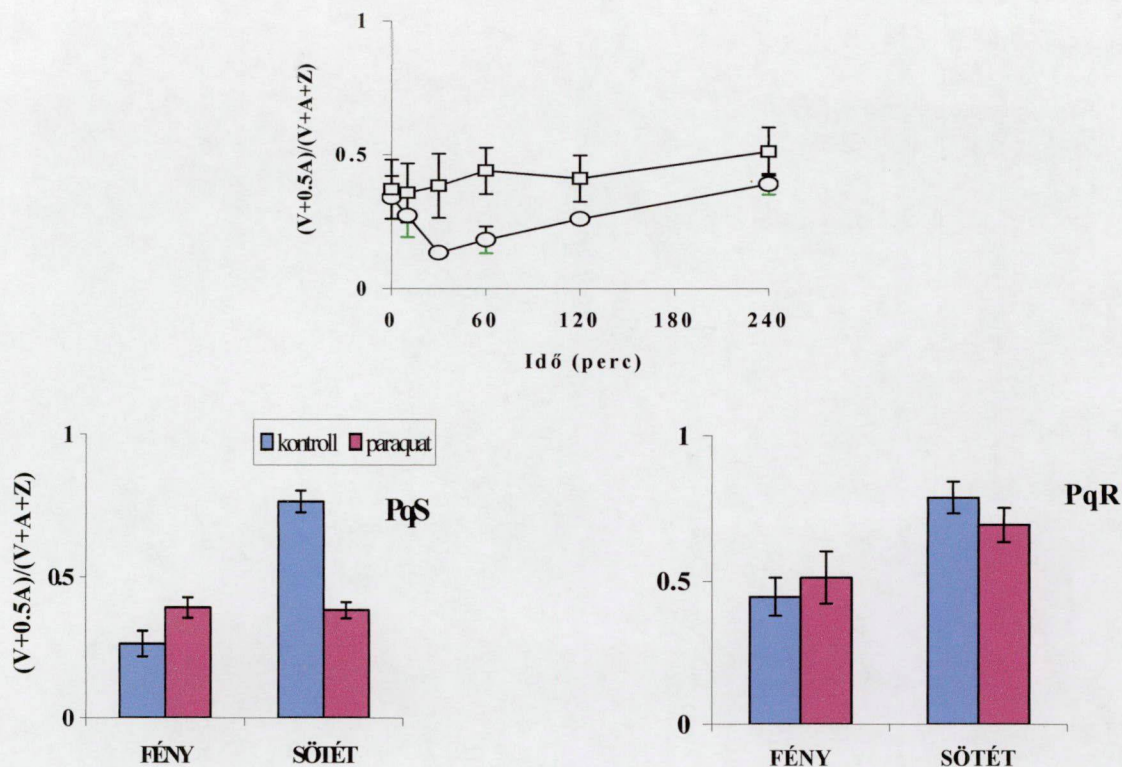
Ha feltételezzük, hogy a PqS növény esetében a paraquat bejutásának mértéke nem függ a megvilágítás erősségétől, akkor azt gondolhatjuk, hogy a látott különbség az eltérő fotoszintetikus elektrontranszport sebesség okozta  $\Delta pH$ -beli változásokat tükrözi. Ha feltételezzük továbbá, hogy a kloroplasztiszban azonos paraquat koncentráció adott fényintenzitáson mindkét biotípusban azonos mértékben gyorsítja fel az elektrontranszportot, azonos nagyságú  $\Delta pH$ -t eredményezve, akkor azt kell hinnünk, hogy a PqR biotípusban – legalábbis az azonnali hatásban – megfigyelhető „ráadás effektus” valamilyen fényintenzitás-függő felvételi mechanizmusnak köszönhető.



**3.2.5. ábra** A xantofill-ciklus epoxidációs indexének időbeli változása a betyárcóró szenzitív (A) és paraquat-rezisztens (B) biotípusainak intakt, a növényen lévő leveleiben 0.1 mM paraquat jelenlétében, különféle megvilágítási fényintenzitások (100 (-O-), 200 (-▽-), 300 (-□-) and 1400 (-◇-)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan aktív fény) mellett. A paraquat-kezelést gyenge megvilágítás (15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felülete megszikkadjon. Az adatok 5 ismétlés átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).



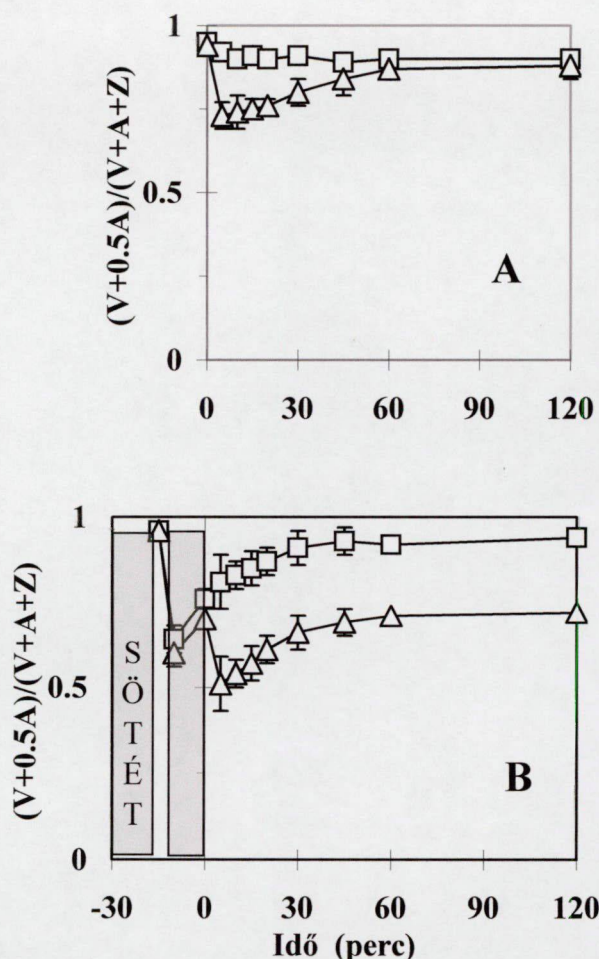
A PqR biotípusban a paraquat-kezelést követő megvilágítás kezdetétől számított 5-10 percben bekövetkezett egy szemlátomást fényintenzitás-függő hirtelen epoxidációs index csökkenés. Ezt követően viszont rögtön megindult egy ZEA epoxidációs folyamat, amelyről azt gondolhatnánk, hogy ez a fotoszintetikus funkció helyreállításának kezdetét jelenti. Csakhogy ez a visszaállás jócskán túlmegy azon a ponton, amelyet az adott megvilágítás mellett a kezeletlen fénykontroll mutat (0.38 helyett 0.7). Ez a jelenség azt sugallja, hogy a VIO de-epoxidációhoz szükséges valamelyik tényező hiányzik. Például, elképzelhetjük a VDE szuperoxid-gyök okozta inaktiválódását, vagy a feltételezett védőmechanizmusok fokozott működtetése miatt előállt viszonylagos aszkorbát hiányt. Az a kérdés is fölmerülhet, hogy miért nem látunk – legalább kezdetben – hasonló jelenséget a PqS növényben. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy a paraquat hatására termelődő oxigéntartalmú szabadgyökök igen hamar tönkreteszik azt a membránstruktúrát, amelyhez a  $\Delta pH$ -függő folyamatok, így a xantofill-ciklus is kötődik. Ezáltal a ciklusról az utolsó élő állapot rögzül a szenzitív levélben, s ezen már csak a később bekövetkező élettelen fotooxidatív folyamatok változtatnak majd. Ezt támasztják alá azok a mérések is, amelyek során a napfényen ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) paraquattal kezelt levelek sötétben lezajló relaxálódását vizsgáltuk (3.2.6. ábra), de csak a rezisztens növényben találtunk működő xantofill-ciklust, a paraquat-kezelt szenzitív növény levelében a xantofill-ciklus már nem mutatott sötét relaxációt.



**3.2.6. ábra** A xantofill-ciklus epoxidációs indexének időbeli alakulása (**fent**) a betyárkóró PqS ( $\square$ ) és PqR ( $\circ$ ) biotípusának leveleiben az intakt növények intenzív napfényen ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) történt 0.1 mM paraquat-oldattal történő kezelését követően. A 4 órás kezelés letelte után a kontroll és kezelt növényeket 1 órára sötétbe helyezve ismét elvégeztük a xantofill-ciklus komponenseinek HPLC-s mérését (**oszlopdíagramok**).

A fény lehetséges szerepének további megismerése céljából kísérletsorozatot állítottunk be, amelyben a betyárkóró paraquat-rezisztens biotípusának intakt növényen lévő leveleiben 0.1mM paraquat jelenlétében mért epoxidációs állapot időbeli lefutását figyeltük meg gyenge fény ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett, majd a kísérletsorozatot megismételtük úgy, hogy egy rövid (5 perces) intenzív ( $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) előzetes fénykezelést is alkalmaztunk ([3.2.7. ábra](#)). A kísérletben a xantofill-ciklus pigmentjeit mintegy belső mérőszondaként alkalmaztuk, hiszen a de-epoxidációs index – legalábbis a kezdeti szakaszban – a lumen savanyodáson keresztül utal a paraquat hatás erősségére. A





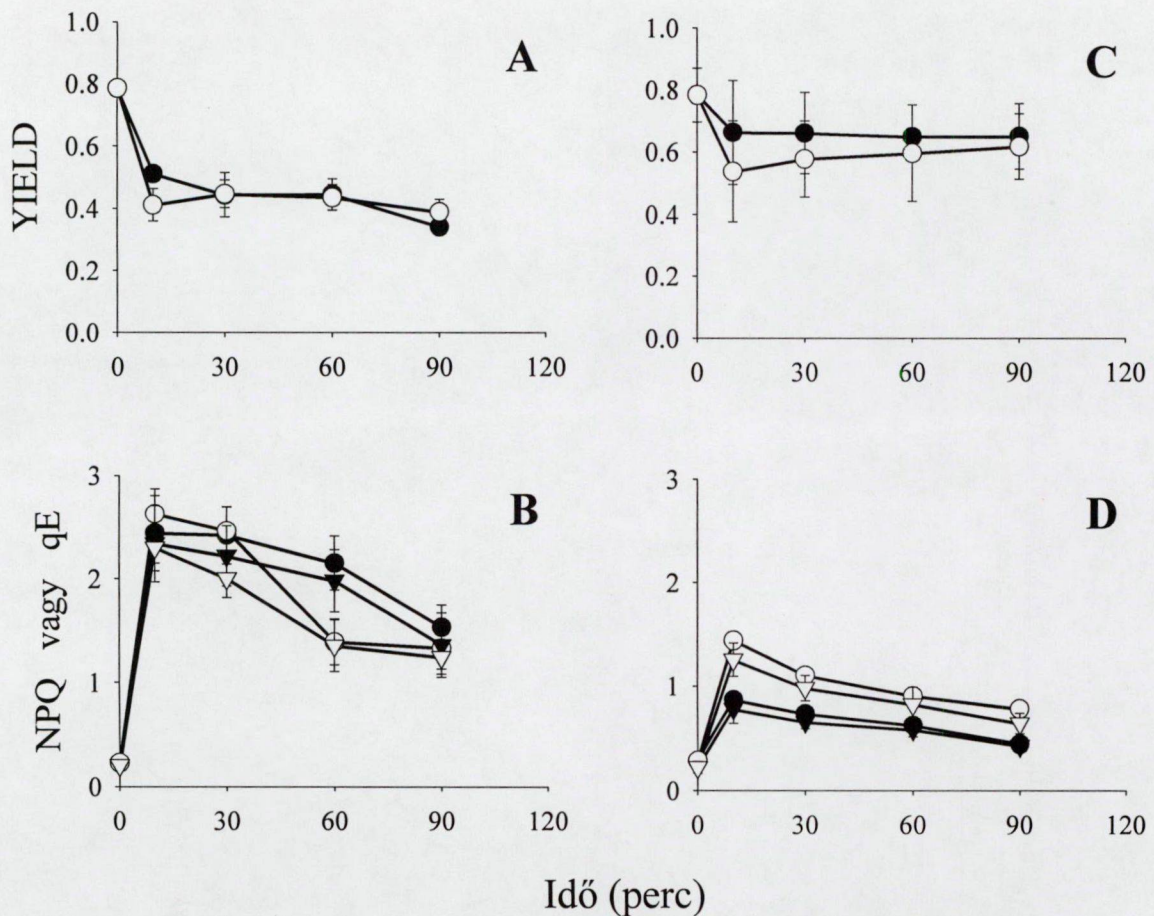
**3.2.7. ábra** A xantofill-ciklus epoxidációs indexének időbeli változása a betyárkóró PqR biotípusának intakt, a növényen lévő leveleiben (A) gyenge fényintenzitás ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett Pq nélkül (□) és 0.1 mM Pq jelenlétében (Δ). Rövid (5 perces) intenzív előzetes megvilágítás ( $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) hatása (B) az epoxidációs index időbeli alakulására a betyárkóró PqR biotípusának intakt, a növényen lévő leveleiben gyenge fényintenzitás ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett Pq nélkül (□) és 0.1 mM Pq jelenlétében (Δ). A paraquat-kezelést nagyon gyenge megvilágítás ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felületén a Pq-oldat megszikkadjon. A rövid előzetes fénykezelést a gyenge fény kezelés megkezdése előtt egy 10 perces sötétkezelés követte, hogy a xantofill-ciklus méréseket és a fluoreszcencia indukciós felvételeket (lásd a későbbi diagramokon) szinkronba hozzuk. Az adatok 6 ismételts átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).

kezeletlen és gyenge fénnel megvilágított kontroll alig észlelhető de-epoxidációja mellett a paraquattal kezelt és ugyanígy megvilágított levelek lényegesen jelentősebb, ám tranziens jellegű de-epoxidációt mutattak (3.2.7.A ábra). Az intenzív előfénykezelés kísérletben (3.2.7.B ábra) az 5 perces  $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan hatékony (400-700 nm) sugárzást követően 10 perc sötétadaptációt iktattunk be, hogy a xantofill-ciklusra vonatkozó méréseink időrendje összhangba kerüljön a későbbiekben ismertetendő fluoreszcencia indukciós mérésekkel. A kezeletlen kontrollban az erős



megvilágításnak megfelelően 5 perc alatt jelentős de-epoxidáció zajlott le ( $E_i \cong 0.65$ ), majd a 10 perces sötét szakaszban figyelemreméltó relaxációt tapasztaltunk ( $E_i \cong 0.75$ ). Ez a relaxáció folytatódott a következő gyenge megvilágítású szakaszban, s 45 perc elteltével teljesen megegyezett a 3.2.7.A ábra szerinti kezeletlen fénykontrollal. Paraquat jelenlétében az 5 perces intenzív elő-fénykezelés hatására gyakorlatilag a megfelelő kezeletlen kontrollhoz hasonló mérvű kezdeti de-epoxidációt, majd a 10 perces sötét szakaszban azzal teljesen párhuzamos meredekségű epoxidációt figyelhattunk meg (3.2.7.B ábra). A gyenge ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) megvilágítás bekapcsolását követően azonban a folyamat nem az 3.2.7.A ábra szerinti, gyenge fény mellett tapasztalható útvonalon haladt tovább, hanem – meglepő módon – csaknem az előzőleg bemutatott 3.2.5.B ábra  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitásának megfelelő görbe szerint futott. Tehát, a paraquat jelenlétében történt előzetes intenzív fénykezelés hatására egy olyan ismeretlen folyamat zajlott le a PqR növény levelében, amely a későbbiekben egy felfokozott paraquat hatásnak megfelelő jelenséget idézett elő. Ennek egyik lehetséges oka – véleményünk szerint – egy fény által elősegített paraquat bejutás a rezisztens növény kloroplasztiszaiba. Ez esetben kimondhatjuk: közvetett bizonyítékok alapján úgy tűnik, hogy a betyárkóró PqR biotípusában a paraquat hatás erősségét feltehetően egy fény által elősegített paraquat bejutás és annak következtében a hatóhelyen kialakuló aktuális paraquat koncentráció szabja meg, s nem önmagában a paraquat jelenlétében folyó fotoszintetikus elektrontranszport sebességének fényintenzitás-függése.

A xantofill-ciklus PqR növényben paraquat jelenlétében mutatott szokatlan viselkedése arra sarkallt bennünket, hogy tüzetesebben vizsgáljuk meg a paraquat-kezelés kezdeti szakaszának fluoreszcencia kioltási kinetikáit. A klorofill fluoreszcencia kioltási folyamatokat egyrészt a PSII fotokémiai folyamatok relatív kvantumhatásfokának ( $\Delta F/F'_m$ ) (3.2.8.A és C ábra), másrészt a nem-fotokémiai kioltás (NPQ) és annak gyorsan relaxálódó, energiafüggő qE komponense (3.2.8.B és D ábra) kiszámításával jellemeztük. A méréseket kis fényintenzitáson ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) és a betyárkóró paraquat-kezelt PqS (3.2.8.A és B ábra) és PqR (3.2.8.C és D ábra) biotípusán egyaránt elvégeztük. A  $\Delta F/F'_m$  egy kezdeti gyors visszaesést követően fokozatosan csökkent a paraquat-kezelt PqS növényben (3.2.8.A ábra üres szimbólumok), miközben az NPQ és annak qE komponense (3.2.8.B ábra üres szimbólumok) kezdetben hirtelen megnövekedett, majd rögtön elkezdett fokozatosan csökkenni, s a megfigyelt 90 perc



**3.2.8. ábra** A PSII fotokémiai folyamatok  $\Delta F/F'_m$  formában kifejezett relatív kvantumhatásfokának (A és C), a nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltásnak (NPQ, -O-) és ennek qE-vel (V) jelölt energiafüggő fluoreszcencia kioltási komponensének (B és D) időbeli alakulása a betyárcóró S (A és B) és PqR (C és D) biotípusainak intakt, a növényen lévő leveleiben 0.1mM Pq jelenlétében, gyenge fényintenzitás ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett (teli szimbólumok). Az üres szimbólumok mutatják a rövid időtartamú (5 perces) nagy intenzitású ( $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) előzetes fénykezelés hatását. A Pq kezelést nagyon gyenge megvilágítás ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percre sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felülete megszikkadjon. A klorofill fluoreszcencia kioltás analízisét egy további 10 perces sötétadaptációt követően hajtottuk végre. Ennek során gyenge intenzitású ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) aktinikus fényt alkalmaztunk, hogy elkerüljük egy esetleges fénygátlás járulékos hatásait. Az NPQ qE komponensét a maximális fluoreszcenciának az aktinikus fény kikapcsolása után bekövetkező relaxációjából számítottuk ki. Az adatok 10 ismétlés átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).

alatt mintegy a felére csökkent. A PqR növényben a paraquat a  $\Delta F/F'_m$ , NPQ és qE paraméterekre a PqS növényhez képest jóval csekélyebb mértékben hatott (3.2.8.C és D ábra üres szimbólumok). Amikor ezt a  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  megvilágítás mellett, 0.1 mM paraquat jelenlétében végrehajtott fluoreszcencia kioltás analízist oly módon ismételtük

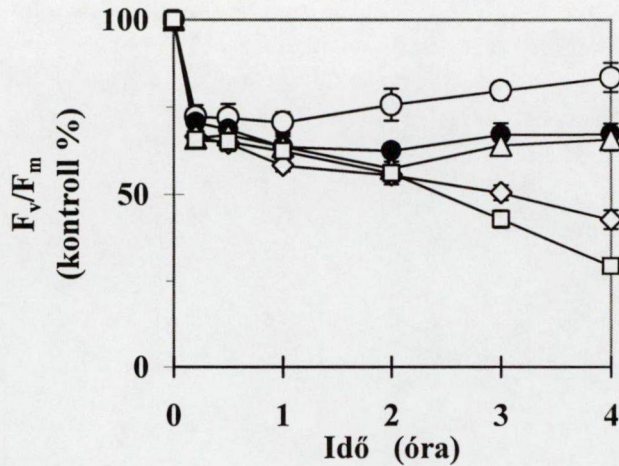
meg, hogy egy 10 perces sötétadaptációt megelőzően egy rövid, de intenzív fénykezelést (5 perc,  $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alkalmaztunk, a két biotípusban eltérő válaszokat kaptunk. A PqS növényben (3.2.8.A és B ábra teli szimbólumok) a PSII relatív kvantumhatásfoka csak az elő 10 percben mutatott valamelyes eltérést, s az NPQ és qE esetében a leszálló ágba mutatkozott egy kis eltérés, komoly effektusról tehát nem beszélhetünk. Kifejezett és hosszantartó – bár a szórások miatt nem mindig szignifikáns – eltérést tapasztaltunk viszont a PqR biotípusnál.

A fluoreszcencia kioltás fenti analízise alapján egyrészt megerősíthetjük azt a képet, miszerint a paraquat-kezelt PqS növény kloroplasztisz membránstruktúrához kötődő funkciói a megvilágítás kezdetét követő percekben már kezdenek károsodni, amint azt az epoxidációs index 3.2.5.A ábra és az NPQ (3.2.8.B ábra) eltérő alakulása is jelez. Másrészt megállapíthatjuk, hogy az előzetes intenzív fénykezelés a paraquat-kezelt PqR növényben

az epoxidációs indexnél (3.2.7.B ábra) látott képpel összhangban befolyásolta a nem-fotokémiai kioltás mértékét (3.2.8.D ábra).

Annak érdekében, hogy további ismereteket szerezzünk a rezisztens növény esetében a paraquat bejutási mechanizmusáról és hatásának koncentrációfüggéséről, különböző koncentrációjú paraquat-oldattal kezelt PqR betyárkóró leveleiben  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  megvilágítás mellett tanulmányoztuk az  $F_v/F_m$  optimális kvantumhatásfok időbeli alakulását (3.2.9. ábra). A kísérletben azért alkalmaztunk kis intenzitású fényt, hogy elkerüljük egy esetleges fénygátlás járulékos hatásait. A paraquat-oldat koncentrációja a 0.1-5.0 mM tartományba esett, amelyen belül a 0.5 mM érték felel meg az üzemi gyomirtási technológiában általánosan alkalmazott töménységnek. E koncentráció alatt (azaz esetünkben 0.1 mM esetén) hasonló mértékű azonnali hatást követően egy – a nagyobb koncentrációkhoz (0.5-5.0 mM) képest jóval gyorsabb – helyreállási folyamatot láthattunk. Megfigyelhettük továbbá, hogy 0.5 és 1.0 mM paraquat koncentráció esetén lassabban, de elindult a helyreállási folyamat ( $F_v/F_m$  növekedés), míg 2.5 és 5.0 mM alkalmazása esetén ez már nem következett be a vizsgált 4 órás időtartam alatt. Az igazán meglepő az volt a 3.2.9. ábra  $F_v/F_m$  görbéi esetében, hogy a legkisebb (0.1 mM) koncentrációt leszámítva az első 2 órában az összes – egyébként jelentősen különböző koncentrációhoz tartozó – diagramvonal együtt futott. Erre kétféle magyarázat látszik elfogadhatónak: (1) az adott fényintenzitás mellett a paraquat változó fluoreszcencia kioltó





**3.2.9. ábra** A PSII fotokémiai folyamatok kvantumhatásfokának ( $F_v/F_m$ ) időbeli alakulása (a kezeletlen kontroll %-ában) az *Erigeron canadensis* (betyárkóró) paraquat-rezisztens (PqR) biotípusának különböző koncentrációjú (○, 0.1 mM; ●, 0.5 mM; △, 1.0 mM; ◇, 2.5 mM; and □, 5.0 mM) paraquat-oldattal kezelt, intakt növényen lévő leveleiben enyhe ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) megvilágítás mellett. A paraquat-kezelést gyenge megvilágítás ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mellett végeztük, majd a kezelt leveleket 10 percig sötétben tartottuk, hogy még megvilágítás előtt a levelek felülete megszikkadjon. A klorofill fluoreszcencia indukció mérését az adott idejű fénykezelést követően egy 10 perces sötétadaptáció után hajtottuk végre. Az adatok 6 ismétlés átlagai és a standard hibát is feltüntettük (látszik, ha nagyobb a szimbólumoknál).

hatása már 0.5 mM külsőleg alkalmazott töménység esetén telítésben van, vagy (2) a kloroplasztiszban a hatóhelyre bejutó paraquat mennyisége a rezisztens növény esetében esetleg nem egyszerűen a koncentráció gradiens függvénye, hanem más tényező (pl. a kezdeti fényintenzitás) is szerepet játszik.

A 3.2.5. ábrán a PqR biotípusra bemutatott jellegzetes kép, amely a VIO de-epoxidáció abnormális csökkenéséről tanúskodik, azt jelenti egyben, hogy az intenzív fénynek kitett növényben csak olyan mérvű a ZEA részvételével kialakuló fotoprotekció, mint egy gyenge fénnel megvilágított növény esetében. Hosszabb idő elteltével ismételten megvizsgálva a paraquat kezelést túlélő és bizonyos paramétereiben (pl.  $F_v/F_m$ ) 24-48 óra elteltével már teljesen helyreállt rezisztens növényeket, azt tapasztaltuk, hogy mind a ZEA képződés, mind az NPQ kialakulása észrevehetően visszafogott maradt a kezeletlen kontrollhoz képest. Tehát a paraquat-kezelt rezisztens növény – bár sikeresen túléli a paraquat támadását – hosszabb távon hiányt szenved egy fényenergia fölösleggel szembeni védőmechanizmusát tekintve. Nyilvánvaló, hogy a védelemnek ezt a hiányát más védőmechanizmusoknak kell pótolniuk és az sem teljesen meglepő, hogy ezek a növények intenzív fényen tovább nevelve szemlátomást visszamaradtak a növekedésben. Ennek érzékeltetésére a 4. Függelék-ben bemutatjuk azt a fényképet, amelyen a kezeletlen kontroll mellett egy közepes és egy erős megvilágítási körülmények között 2 hónapig továbbnevelt paraquat-kezelt rezisztens növényanyagot

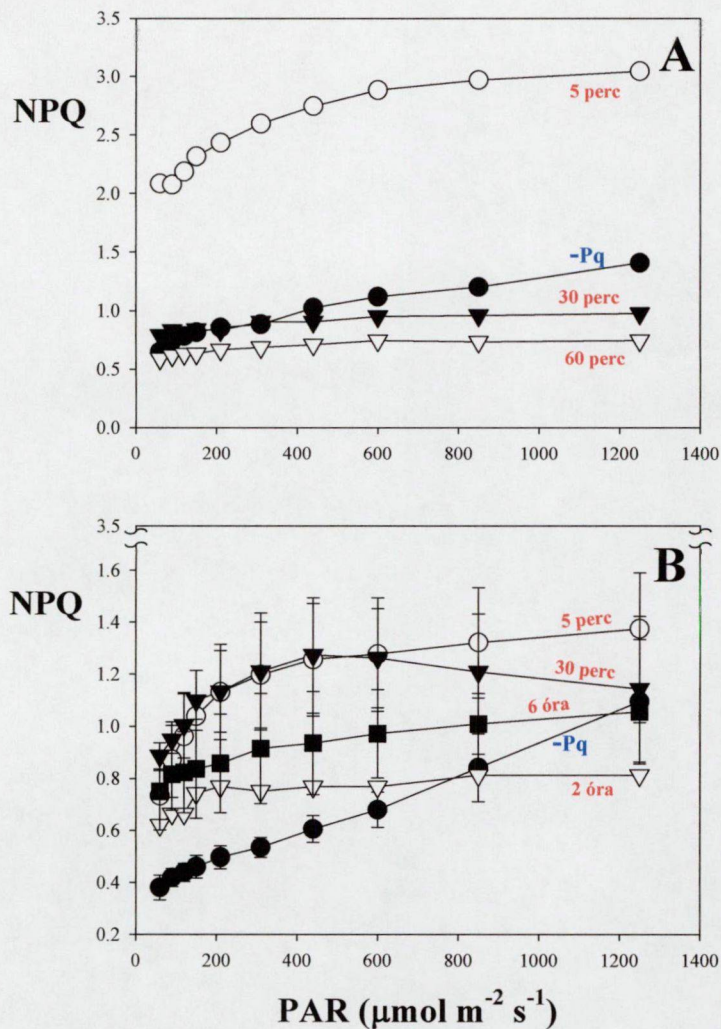
látunk. Kérdés, hogy a nem-fotokémiai kioltás csökkent mértéke önmagában megmagyarázza-e ezt a jelenséget, vagy a csökkent VIO de-epoxidáció hátterében sejtett aszkorbát hiány is közrejátszik. A szakirodalomban találunk utalásokat arra, hogy az aszkorbát hiány növényekben csökkent növekedést okoz (Pastori et al. 2003), illetve számos olyan gén expresszióját befolyásolja, amely az antioxidáns védelmi rendszereket és a fotoszintézist érinti (Kiddle et al. 2003, Pastori et al. 2003). Mindezeket az eredményeket az *Arabidopsis thaliana* aszkorbát hiányos *vtc* mutánsával kapták, amelyről azt is kimutatták, hogy csökkent mértékű NPQ kialakulást mutat (Smirnoff 2000).

A sötétbe adaptálódott PqR növényeken elvégzett paraquat-os modellkísérletek meglepő eredményeit látva nyilvánvalóan felmerül a kérdés, vajon hasonló jelenséget tapasztalhatunk-e a természetes körülmények között, például intenzív napsütéstől fénygátlásban szenvedő növények levelein történő paraquat kezelést követően. Egy ilyen típusú kísérlet eredményeit már előzetesen bemutattuk a 3.2.6. ábrán, ahol egyrészt láthatjuk a xantofill-ciklus időbeli alakulását a Pq-kezelést követően, valamint a 4 órás Pq-hatást követő sötét relaxáció eredményét (3.2.6. ábra, oszlopdiagramok) a PqS és PqR betyárkóró levelében. A PqS növényben a ciklus érdekes módon szinte egyáltalán nem reagál további de-epoxidációval, ami arra utal, hogy intenzív fényen alkalmazva a Pq feltehetően nagyon hamar tönkreteszi azokat a membránstruktúrákat, amelyben a xantofill-ciklus működik. Ez az állapot a továbbiakban gyakorlatilag rögzül, amely mögött azonban nincsen működő xantofill-ciklus, amint az a 3.2.6. ábrából is látható. A PqR növény esetében a Pq-kezelés hatására az első 30 percben mintegy a felére csökken az epoxidációs index értéke, majd folyamatosan emelkedve 4 óra elteltével már gyakorlatilag eléri a kezeletlen kontroll szintjét. Ez azt jelenti, hogy (1) a Pq a rezisztens növényben is bejut a kloroplasztiszbába, de (2) ott nem okoz irreverzibilis membránkárosodást és (3) 30 perc elteltével már érvényre jutnak a Pq hatását eltüntető folyamatok.

A fenti kép kiegészítését és megerősítését szolgálták azok a klorofill *a* fluoreszcencia kioltási mérések, amelyeknek eredményeit a 3.2.10. ábrán mutatom be. Ezen kísérletben az NPQ folyamat fény indukálhatóságának vizsgálata volt a cél. A 4 órán át intenzív fényen ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) megvilágított majd Pq-tal kezelt és ezután eltérő ideig intenzív fényen tartott levelek 30 perc sötét adaptációt és a rákövetkező 5 perces  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  elővilágítást követően a diagramokon látható módon reagáltak az 5 perces időközökben megnövelt intenzitású PAR besugárzásra a  $60\text{-}1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



tartományban. A PqS növény levelében az 5 perces kezelést követően már az 5 perces  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  elővilágítás jelentős (2.0 körüli) NPQ-t eredményezett, amely a fényintenzitás növelésével



**3.2.10. ábra** Paraquat-kezelés hatása fénygátolt betyárkóró levelekben kialakuló nem-fotokémiai kioltás (NPQ) fényválaszára. A 4 órán át  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fénnel megvilágított intakt növényeket  $0.1 \text{ mM}$  paraquat oldattal kezeltük, majd ugyanezen fényintenzitáson eltérő ideig hagyva, 30 perc sötétadaptációt és 5 perc  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású elővilágítást követően a  $60\text{--}1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tartományban felvettük az NPQ fényválasz görbéit. Az  $F_0$  és  $F_m$  értékeket a sötétadaptáció után, az  $F_m'$  értékeket pedig az egyenként 5 perces fénylépcső szakaszok utolsó 10 másodpercében alkalmazott telítési fényimpulzus ( $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alkalmazásával határoztuk meg. A méréseket 12 ismételtsben végeztük.

még tovább (mintegy 3.0 értékre) fokozódott. A 30 és 60 perces kezeléseket követően azonban egyre inkább megszűnt az NPQ indukálhatósága. Ez a kép összhangot mutat a xantofill-ciklusra vonatkozó analitikai adatokkal. Ezzel szemben a PqR növényben a különböző időtartamú intenzív fény + Pq kezelések nyomán az 5 perces  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



<sup>1</sup> elővilágítás hatására viszonylag mérsékelt (0.6 és 0.9 közötti) és az idővel csökkenő tendenciát mutató kiindulási NPQ értékek alakultak ki, amelynek további indukálhatósága az 5 perc, 30 perc, 1 óra és 2 óra kezelési idők után egyre kevésbé volt megfigyelhető (rendre 1.4, 1.1 és 0.8 maximális NPQ értékek), s mindössze 6 óra elteltével kezdte mutatni a helyreállítás jeleit (megközelítve a kontroll 1.1-es maximális NPQ értékét). Ennek alapján úgy tűnik, hogy az intenzív fényen történő Pq-kezelés esetében a xantofill-ciklus de-epoxidációs állapota és a fluoreszcencia adatokból számítható NPQ értéke nem szinkronban alakul. Tekintve, hogy a szakirodalomban nem találunk ilyen típusú méréseket, az eredmények értelmezése során munkám jelenlegi szakaszában csupán feltevésekre szorítkozhatok. Mivel a PqS növény esetében nem tapasztalható a xantofill-ciklus és az NPQ folyamat eltérő reagálása, feltételezhető, hogy az NPQ fluoreszcencia kioltási paraméter használata intakt levélen alkalmazott Pq-kezelés esetében korrekt eljárás. Ennek alapján kijelenthető, hogy a PqR növény esetében tapasztalt anomália vagy (1) közvetlenül a rezisztencia mechanizmusából fakad, vagy (2) a Pq eddig nem ismert hatásából ered, amely itt éppen azért figyelhető meg, mert a PqR növény irreverzibilis membránkárosodás nélkül túléli a Pq hatását.

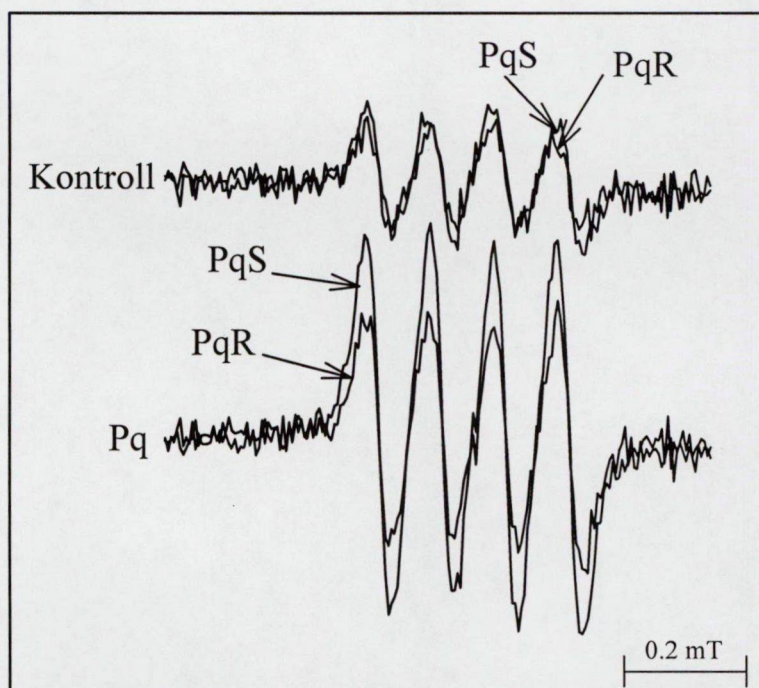
### **3.2.3. Szuperoxid szabadgyökök keletkezése**

A 3.2.1. ábrán a fotoszintetikus oxigénfejlődés paraquat hatására történő változásai azt mutatják, hogy (1) a szenzitív növény esetében 1 óra elteltével már az oxigénfogyasztó folyamatok kerülnek túlsúlyba, és (2) a rezisztens növény levelében a nettó oxigénfejlődés átmenetileg több órára visszaesik. Ez összhangban áll a szakirodalomban a paraquat hatásmódjára egyöntetűen elfogadott mechanizmussal, miszerint a paraquat a fotoszintetikus elektrontranszport láncból elnyert elektront azonnal továbbadja a mindenütt jelenlévő molekuláris oxigénnek, szuperoxid anion szabadgyök keletkezését eredményezve. A látott kép egyrészt azt jelzi, hogy (1) a szenzitív növény esetében 1 óra paraquat kezelés hatására a PSII oxigénfejlesztő komplexe is tönkremegy, másrészt azt, hogy (2) a rezisztens növény levelében is eljut a paraquat a hatóhelyre, de a szuperoxid szabadgyök termelő folyamat hatékonysága fokozatosan csökken és a vízbontó komplex sem megy tönkre. Mindezen feltételezéseknek azonban nem találtuk kísérletes bizonyítását a szakirodalomban, jóllehet ennek ismerete a paraquat hatásmódjának, de méginkább a paraquat-rezisztencia mechanizmusának felderítése szempontjából kulcsfontosságú. Ezért az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében Dr.

Hideg Éva tudományos tanácsadóval együttműködve gyök csapdázásos ESR méréseket végeztünk annak eldöntésére, hogy a betyárkóró mindkét – szenzitív (PqS) és paraquat-rezisztens (PqR) – biotípusának leveleiben keletkeznek-e szuperoxid szabadgyökök a paraquat kezelés

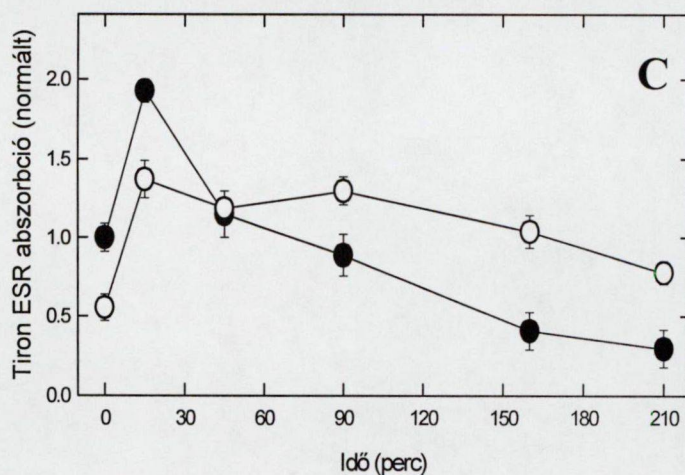
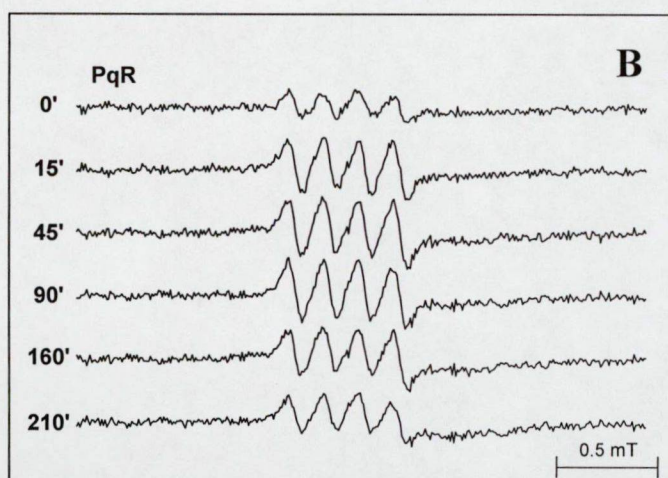
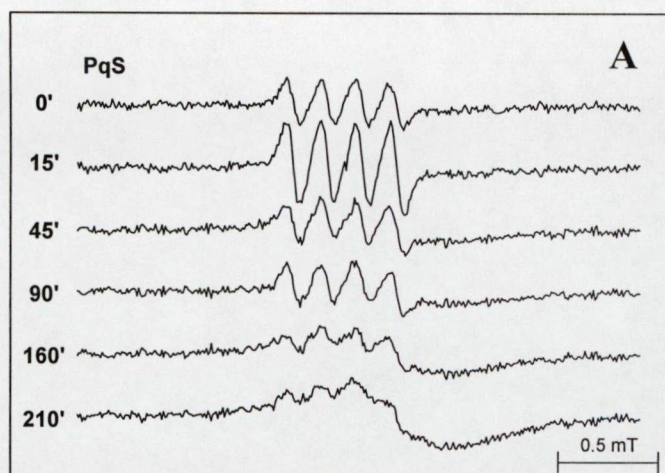
hatására és milyen a szuperoxid szabadgyök koncentráció időbeli alakulása. Azt tapasztaltuk, hogy a szuperoxid gyök képződés a paraquat kezelés során változó volt, a kezdeti szakaszban dinamikus növekedést mutatott és hosszabb, több órás kezelés után monoton csökkenés volt megfigyelhető.

A 3.2.11. ábra bemutatja a paraquat kezelés előtt és a legjelentősebb különbséget mutató 10 perces paraquat-hatást követően Tiron gyökcsapdával kapott fény mínusz sötét ESR jeleket. A jel amplitúdója arányos a levélben a mérést megelőző 2 perces megvilágítás és az ESR spektrum felvétel időtartama (3 perc) alatt képződő szuperoxid gyök koncentrációval. Látható, hogy a szenzitív levélben paraquat távollétében is megfigyelhető egy fény indukálta szuperoxid gyök többlet. A továbbiakban hosszabb időtartamú



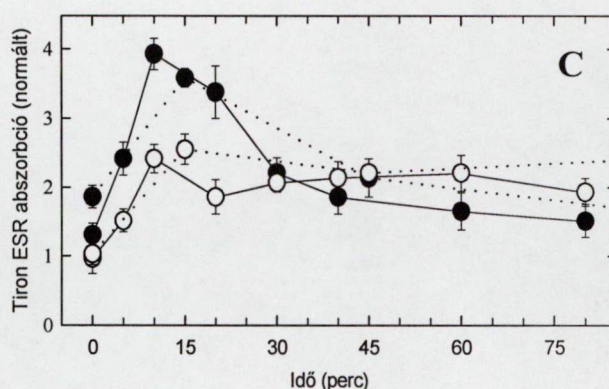
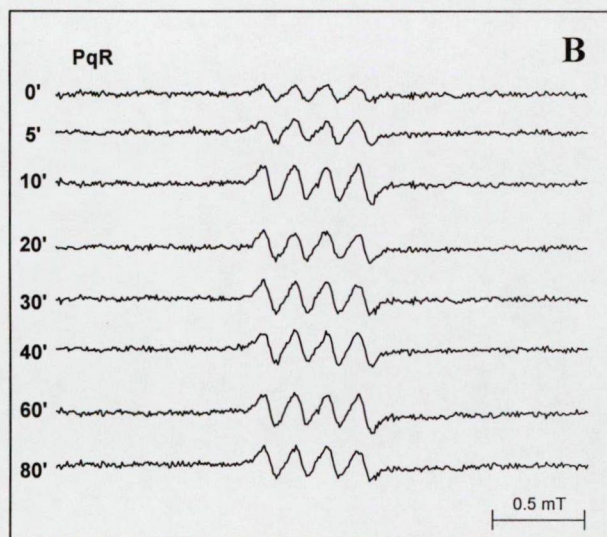
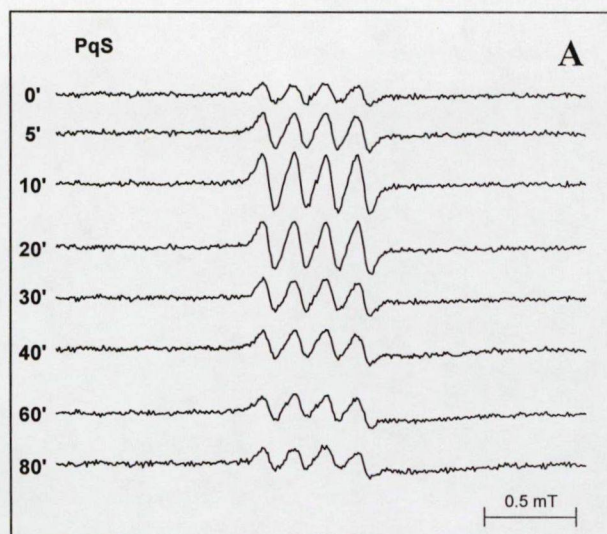
**3.2.11. ábra** Szuperoxid gyök mérés (Tiron gyökcsapda ESR spektruma, megvilágított mínusz sötét jel) kezeletlen (Kontroll) és  $2 \times 10^{-5}$  M paraquattal 10 percig előkezelt (Pq) tölevélrózsás betyárkóró (*Erigeron canadensis*) levelekben. Excizált, az ESR mérés előtt  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan hatékony fénnel 10 percig megvilágított paraquat-szenzitív (PqS) és -rezisztens (PqR) levelek.





**3.2.12. ábra** Szuperoxid gyök mérés (Tiron gyökcspada ESR spektruma, megvilágított mínusz sötét jel)  $2 \times 10^{-5}$  M paraquattal előkezelt és  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan hatékony fénnel eltérő ideig megvilágított betyárkóró (*Erigeron canadensis*) levelekben. Paraquat-szenzitív (PqS, A) és -rezisztens (PqR, B) leveleken felvett spektrumok. A fény indukálta szuperoxid gyök keletkezés a paraquat előkezelés időtartamának függvényében (C) a PqS (●) és PqR (○) betyárkóró excizált levelében.





**3.2.13. ábra** Szuperoxid gyök mérés (Tiron gyökcsapda ESR spektruma, megvilágított mínusz sötét jel)  $2 \times 10^{-5}$  M paraquattal előkezelt és  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan hatékony fénnel eltérő ideig megvilágított tölevélrózsás betyárkóró (*Erigeron canadensis*) levelekben. Paraquat-szenzitív (PqS, **A**) és -rezisztens (PqR, **B**) leveleken felvett spektrumok. A fény indukálta szuperoxid gyök keletkezés a paraquat előkezelés időtartamának függvényében (**C**) a PqS (●) és PqR (○) betyárkóró leveleiben (folytonos vonalak). A diagramon szemléltetésül feltüntettük a kifejlett növények levelein végzett ESR mérések (3.2.12.C ábra) kezdeti adatait (szaggatott vonalak).



méréseket végeztünk és a betyárkóró két különböző fenológiai fázisában (tőlevélrózsás és szárba szökkenő növények) tapasztalható képet is összehasonlítottuk.

A 3.2.12. ábra egy 3 és fél órás kísérlet adatait mutatja be, amelyet kifejlett de még nem virágzó állapotú növény egyedek levelein történt ESR méréssel kaptunk. A betyárkóró tőlevélrózsás fejlettségi állapotú egyedeinek leveleiben csak a folyamat kezdeti 80 perces szakaszát tanulmányoztuk, viszont a méréseket rövidebb időközönként végeztük el (3.2.13. ábra). Amint a fény mínusz sötét regisztrátumokból és a normalizált ESR jelek diagramjából (3.2.12.C ábra és 3.2.13.C ábra) egyöntetűen megállapítható, a mérést megelőző 2 perces megvilágítás és az ESR mérés időtartama (3 perc) alatt együttesen keletkező fény indukálta szuperoxid szabadgyök koncentráció – amely arányos a bemutatott fény mínusz sötét Tiron ESR jel nagyságával – a paraquat-kezelés kezdetén (10-15 perc) mindkét biotípus levelében jelentősen megnövekedett, majd a PqS biotípus levelében egy monoton csökkenés mutatkozott, amely 2 óra elteltével (3.2.12.C ábra) már a kiindulási szint (0 perc elővilágítás) alá süllyedt. Fontos megjegyezni, hogy a szenzitív növényben 45 percet meghaladó paraquat kezelés esetén a Tiron-OOH jellegzetes 4 vonalas ESR jele mellett megfigyelhető volt egy széles ESR abszorpció is. Ennek eredete a szakirodalomban is vitatott, de általában előrehaladott szeneszencia és súlyos oxidatív stresszhatás kísérőjelensége (Merzlyak & Hendry 1994). Ez az ESR komponens sokkal nagyobb volt a PqS mintákban, mint a PqR levelekben, ami a szenzitív növényekben lezajló stresszreakciók intenzívebb voltát támasztja alá. Ezzel szemben a PqR növény levelében – bár a kezdeti gyors emelkedés mértéke a kifejlett növény esetében közel megegyezett a PqS biotípusával – mintegy 2 órán keresztül gyakorlatilag megmaradt a kezdetben kialakult szuperoxid szint, s csak azután indult el egy lassú csökkenés. Ezáltal a PqR növény levelében még 3 és fél órás paraquat-hatást követően is a kiindulási állapotnál (kezeletlen fénykontroll) nagyobb maradt a szuperoxid koncentrációja.

Az itt bemutatott ESR mérésekből az alábbi fontos következtetéseket vonhatjuk le:

- a rezisztens növény levelében a paraquat kezelés és fény hatására éppúgy megjelennek a paraquat által generált szuperoxid gyökök, mint a szenzitív növény esetében, tehát az általunk megfigyelt paraquat-rezisztencia nem a paraquat kloroplasztiszbba való bejutásának gátlásán alapul,
- a szenzitív növényben a szuperoxid termelődés extrém csökkenése azt jelzi, hogy 2 óra elteltével még az itt alkalmazott kis paraquat koncentráció és gyenge

fény mellett is bekövetkezik a fotoszintetikus elektrontranszport teljes károsodása, miáltal már a paraquat sem képes további szuperoxid gyököket képezni,

- a kezeletlen fénykontroll mintákban mérhető szuperoxid szintek kismértékű eltérései azt sugallják, hogy a rezisztens növény valamelyest hatékonyabb elimináló rendszerrel bír, vagy esetleg más okból kisebb mértékű a szuperoxid szabadgyök képződés.

Ez utóbbi megállapítás látszólag összhangban van a Gressel-féle paraquat-rezisztencia elmélettel (Gressel 1995), amely szerint a felfokozott aktivitású antioxidáns enzimrendszer létrehozva egy általános oxidatív stressztoleranciát feltételeznek a PqR növényben (Youngman & Dodge 1981, Shaaltiel et al. 1988). Az ESR méréseink alapján itt kirajzolódó kép korántsem azt igazolja, hogy a betyárkóró esetében az antioxidáns enzimrendszer fokozott aktivitása lenne a paraquat-rezisztencia alapja (Turcsányi et al. 1998). Ráadásul az is egyértelműen látszik, hogy a paraquat hatására kialakuló szuperoxid koncentráció mindkét biotípusban független a fenológiai fázistól.

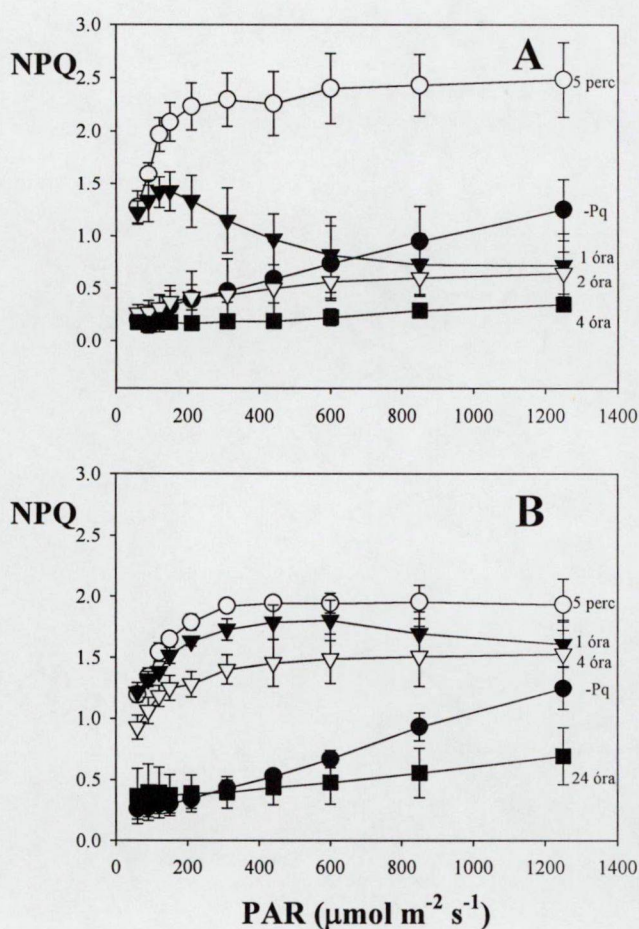
A paraquat-kezelt rezisztens növény levelében meglehetősen sokáig tapasztalt megnövekedett szuperoxid szint azt jelzi, hogy a paraquat hosszasan kifejtheti káros hatását a rezisztens növény kloroplasztiszában, s ez energetikailag valószínűleg tartósan igénybe veszi a növény antioxidáns védekezési mechanizmusait és redukáló ágens készleteit. Ez hipotézisünk szerint okozhatja egy elhúzódó aszkorbáthiányos állapot kialakulását, amely viszont csökkent mértékű VIO de-epoxidációt eredményezhet. A Pq hatásának megfigyelt gyengülését – amelynek hátterében feltételezhetően a Pq hatóhelyi koncentrációjának csökkenése húzódik meg – csak egy további, ezideig azonosítatlan mechanizmus okozhatja.

Van egy újabban felismert jelátviteli rendszer, amelynek révén a növény egyik levelén jelentkező oxidatív stressz hatására más levelekben is indukálódnak a citoszolban APX mRNS-ek és feltehetően az APX aktivitás is fokozódik (Karpinski et al. 1997). Arra is utalnak, hogy súlyosabb oxidatív stressz esetén a kloroplasztiszból és a fénylégzés kapcsán a peroxiszmákban kiszivárgó hidrogénperoxidot a citoszolban kell hatástalanítani. A Pq kezelés során igen súlyos oxidatív stresszről beszélhetünk, amely a PqS növény esetében nem is ad lehetőséget a hatékony védekezésre, a növény egyes élettani alapfolyamatai percek alatt szabályozatlanná válnak, vagy megszűnnek, s 1-2 óra alatt teljes a pusztulás. Érdekes lenne azonban feltételezni és megvizsgálni egy ilyen nagyobb hatótávolságú jelátviteli rendszer működését a Pq-kezelt PqR növényben,



amely – legalábbis a kezdeti időszakban bizonyítottan – hasonlóan súlyos oxidatív stresszhatásnak van kitéve, mint a PqS növény.

A szuperoxid gyök mérési eredmények kiegészítéseként, hasonló körülmények között elvégzett paraquat kezelést követően tanulmányoztuk a szenzitív és PqR betyárkóró levelében az NPQ fényválasztát (3.2.14. ábra). A betyárkóró intakt, excizált levelében a  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR mellett eltérő ideig végzett Pq-kezelés után alkalmazott 30 perc sötét



3.2.14. ábra A nem-fotokémiai kioltás fényválaszának alakulása (A: PqS, B: PqR) betyárkóró levelében, paraquat jelenlétében eltérő ideig alkalmazott  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR megvilágítást követően. 30 perc sötétadaptációt és 5 perc  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású elővilágítást követően a  $60\text{--}1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tartományban felvettük az NPQ fényválasz görbéit. A diagramon 8 mérés átlagát és szórását tüntettük fel.

adaptációt és a rákövetkező 5 perces  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  elővilágítást követően az NPQ a diagramokon látható módon változott az 5 perces időközökben megnövelt intenzitású PAR besugárzásra a  $60\text{--}1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tartományban. A PqS növény esetében (3.2.14.A ábra) 5 perces és 1 órás Pq-kezelést követően a kontrollhoz (0.2) képest

jelentősen nagyobb (1.3) értékről indult az NPQ fényválasz görbéje. Azonban, míg az 5 perces kezelés esetén jól indukálható maradt az NPQ (maximális szintje mintegy 2.5 volt a kontroll 1.2 körüli értékéhez képest), addig az 1 órás kezelés után már lecsengő fényválaszt tapasztaltunk (mintegy 0.8-as végértékkel), s a hosszabb tartamú kezelések még fokozottabb leromlást mutatnak. A PqR növény esetében (3.2.14.B ábra) szintén megfigyelhető az NPQ indukálhatósága, amely azonban alacsony és magas fényintenzitásoknál egyaránt fokozatosan csökken. Igaz, hogy a kontrollhoz képest (kb. 1.1-es maximális NPQ) az 5 perces, 1 órás és 4 órás kezelések még egy jobban indukálható NPQ folyamatot jeleznek (rendre 2.0, 1.6 és 1.4 körüli maximális NPQ-t eredményezve) azonban 24 óra elteltével  $1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR-nál mindössze 0.6 körüli az NPQ értéke. Megállapítható tehát, hogy alacsonyabb fényintenzitás ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR ) mellett az NPQ kialakításáért felelős folyamatok hosszabb távon károsodnak, amely látszólag jó összhangban van azzal, hogy a PqR növény levelében ilyen körülmények között csak nagyon lassan csökkent a Pq-indukálta szuperoxid gyök koncentráció. Nem zárható ki, hogy valamilyen, eddig ismeretlen módon a hosszan fennmaradó fokozott szuperoxid termelés okozza az NPQ folyamat átmeneti sérülését. Ugyanakkor, az intenzív fényen végzett kezelések eredményeivel (3.2.10. ábra) összevetve úgy vélhetjük, hogy az NPQ folyamat ott tapasztalt gyorsabb helyreállása a rezisztenciával járó helyreállítási folyamatok pozitív fényfüggését jelenti.



## 4. Összefoglalás

A fotoszintézis fölös fényenergiával szembeni védelme (fotoprotekció) egy kiegyensúlyozási folyamat. A termikus disszipáció és az alternatív elektrontranszport utak, az antennaméret és az átfogó fotoszintetikus teljesítmény változásaival együtt, segítenek egyensúlyt teremteni a fényabszorpció és hasznosulás között egy állandóan változó természeti környezetben. A reaktív oxigénformák keletkezését az antioxidáns rendszerek ténykedése ellensúlyozza. A helyreállítási (repair) folyamatok teljesítőképességének egyeznie kell a kártétellel, amelyet az egyéb fotoprotektív folyamatok nem voltak képesek megakadályozni. Többszörös, együttműködő és részben átfedő, redundáns mechanizmusok segítenek kivédeni azt a nettó fotooxidatív károsodást, amelyet a fotoszintézis során termelődő reaktív molekulák okoznának. A redundancia nem meglepő, ha tekintetbe vesszük, hogy milyen kritikus a megfelelő fotoprotekció a növények fitnessze és túlélése szempontjából a legtöbb növénykörnyezetben. Valóban, a fotoprotekcióban résztvevő számos molekula és enzim egynél több védőmechanizmusban is szerepet játszik. Például, a xantofillek egyaránt részei a hődisszipációnak és a  $^1\text{O}_2$  kioltási folyamatának, míg a SOD és az APX enzimek befogják a reaktív oxigénformákat, miközben a víz-víz cikluson keresztül fenntartják az elektrontranszportot.

A gyengébb kompetíciós képesség és kisebb bioprodukción az AR növények esetében általánosan ismert jelenség, amelyet azonban a D1 mutáció önmagában nem magyaráz, s amelynek háttérében elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos, de még kevésbé ismert élettani mechanizmusok lehetnek. Egyelőre bizonyos kísérőjelenségek ismertek (ún. pleiotróp hatások), mint például a késleltetett fluoreszcencia lecsengésben is tükröződő lelassult  $\text{Q}_\text{A} \rightarrow \text{Q}_\text{B}$  elektronátmenet, s a termolumineszcenciás B-sáv eltolódása, vagy a megváltozott lipidösszetétel és ezzel kapcsolatba hozható fokozott membrán fluiditás, s a hőmérsékleti adaptáció korlátozott volta, vagy éppen az általunk kimutatott és tanulmányozott csökkent mérvű ZEA képződés.

A célkitűzésekben megfogalmazott kutatási program keretében *Amaranthus retroflexus* L. (szőrös disznóparéj), *Chenopodium album* L. (fehér libatop), *Epilobium adenocaulon* Hausskn. (jövevény fűzike), *Erigeron canadensis* Cronq. (betyárkóró), *Senecio vulgaris* L. (közönséges aggófű) és *Solanum nigrum* L. (fekete csucsor) vad és D1 protein

mutáns (atrazin-rezisztens, AR), valamint az *Erigeron canadensis* Cronq. (betyárkóró) vad, paraquat-rezisztens (PqR) és paraquat-atrazin ko-rezisztens (PqAR) biotípusain kapott fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimiláció és O<sub>2</sub>-fejlődés, klorofill *a* fluoreszcencia indukció és HPLC-s karotinoid eredményeket áttekintve az alábbi megállapításokat teszem.

#### **A D1 protein mutáns gyombiotípusokra vonatkozó megállapítások:**

- Megállapítottam, hogy a vizsgált D1 protein mutáns kétszikű C3 típusú fotoszintézissel rendelkező gyomnövények egységnyi levélfelületre vonatkoztatott nettó CO<sub>2</sub>-asszimilációs rátája gyakorlatilag nem különbözik a vad biotípusétól, csökkent értéket egyedül a C4-es AR szőrös disznóparéj esetében tapasztaltam. Összes klorofill tartalomra vonatkoztatva már a fehér libatop és a közönséges aggófű esetében is kimutatható hasonló tendencia, s a szőrös disznóparéj esetében még nagyobb eltérés mutatkozott, mint levélfelületre számolva. Feltételezhető, hogy az AR növényeknél általánosan megfigyelt csökkent bioprodukciónak háttérében nem a fotoszintézis csökkent intenzitása lehet az általános ok.
- Kimutattam, hogy a hőmérsékleti stressz hatására a fekete csucor AR biotípus fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-fixációja jelentősebben csökken, mint a vad biotípusé, amely természetes körülmények között hozzájárulhat a mutáns növények kisebb bioprodukciónak. A hőstressz okozta fotoszintetikus teljesítmény romlás kimutathatóan nem szótma limitáció következménye volt, tehát valószínű oka a Rubisco aktivitás és a RuBP regenerálódási sebesség csökkenésében keresendő.
- A vizsgált kétszikű gyomfajok esetében a D1 protein mutánsokban általánosan megfigyelhető volt az *in vivo* klorofill fluoreszcencia mérésekből számított PSII lineáris elektrontranszport sebesség, a fotokémiai kioltási koefficiens és a nem-fotokémiai kioltás csökkenése.
- Megállapítottam a D1 protein mutáns gyomnövények fénygátlással szembeni nagyobb fényérzékenységet, amelyet jól tükröz az AR biotípusok megnövekedett fényérzékenységi indexe ((1-qP)/NPQ). Ez arra utal, hogy a fotokémiai és nem-fotokémiai energia hasznosulás egyensúlya kedvezőtlen irányban tolódott el az AR biotípusok esetében.



- A PSII által elnyelt energia hasznosulására alkalmazott energia allokációs modellszámítások jól tükrözték az AR biotípus csökkent fotokémiai teljesítményét, de egyes fajoknál a disszipációra kapott részarány nem áll teljesen összhangban a számolt NPQ értékekkel.
- Az AR biotípusok pigment összetételében megfigyeltem a klorofill *a/b* arány már ismert, jellegzetes csökkenését. A xantofill-ciklus készletek nagysága között a kétféle biotípusban nem mutatható ki szisztematikus különbség.
- A xantofill-ciklus aktivitására vonatkozó méréseim alapján megállapítottam, hogy a D1 protein mutációval rendelkező C3 gyomfajokra általánosítható a betyárkórónál először megfigyelt, közel 30%-kal csökkent de-epoxidációs képesség. A xantofill-ciklus kisebb kapacitásával részben megmagyarázható az NPQ folyamatok csökkenése az AR biotípusokban.
- Külső aszkorbát, mint xantofill-ciklus kofaktor, levélbe juttatásával folytatott kísérletek eredményei alapján megállapítottam, hogy a D1 protein mutáns gyomnövényekben a xantofill-ciklus aktivitás és az NPQ kialakulás részleges gátlása mögött nem egyértelműen és nem általánosan mutatható ki az aszkorbát hiánya. Közvetve ezt igazolja az is, hogy metilviologén jelenlétében intakt betyárkóró levelekben gyakorlatilag megszűnik a vad és AR biotípusok közötti NPQ és de-epoxidációbeli különbség.

Feltételezésem szerint az AR növényben az elnyelt fényenergia energia rosszabb fotokémiai hasznosulása és a ráadásul kisebb teljesítményű energia disszipáció folytán nagyobb mennyiségben keletkező toxikus fotoproduktumok fokozottan igénybe veszik az antioxidáns védőenzim rendszert és kiváltják a D1 protein nagyobb sebességű lebomlását és helyreállítását. Mindezen folyamatok fokozottan fogyasztják az AR növény levelében termelt redukáló ágens készletet és a nagyobb intenzitású *de novo* fehérjeszintézis folyamatosan nagyobb mértékben használja föl a fotoszintetikus begyűjtött karbonkészletet. Ez okozhatja végül – különösen a magas hőmérsékleten a D1 protein mutánsnál megfigyelt gátolt nettó fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációval párosulva – az AR növények rosszabb bioprodukcióját, csökkent kompetíciós képességét.

### **A Pq hatására és a PqR betyárkóróra vonatkozó megállapítások:**

- A paraquat hatásának tanulmányozása során kimutattam, hogy a Pq-szenzitív (vad és AR) biotípusokban a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-fixáció Pq jelenlétében 10 percen belül megszűnik. Bebizonyosodott, hogy ez a folyamat is fényfüggő, de már viszonylag enyhe megvilágítás (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) mellett is gyorsan bekövetkezik. A PqR betyárkóró levelében Pq jelenlétében a CO<sub>2</sub>-fixáció átmeneti gátlást követően már az első órában kezdett helyreállni.
- Pq jelenlétében fény hatására extrém és irreverzibilis de-epoxidáció figyelhető meg a Pq-szenzitív növényekben, amelynek mértékekevésé függ a fényintenzitástól. A jelenség hátterében egyrészt a természetesnél nagyobb mérvű lumensavanyodás állhat, másrészt az irreverzibilitás oka a membránstruktúrák gyors és visszavonhatatlan károsodása lehet.
- A PqR betyárkóró levelében Pq jelenlétében a xantofill-ciklus tranziens de-epoxidációja volt megfigyelhető az első 30 percben, amelyet követően viszont még a kezeletlen fénykontrollénál is kisebb mérvű de-epoxidáció volt tartósan megfigyelhető, amely mögött tartós aszkorbát hiány állhat. Ezzel összhangban az NPQ nagysága is tranziens felfutást mutatott, majd tartósan a fénykontroll szintje alatt maradt. Ennek következtében a Pq-kezelt PqR növény hosszú időn keresztül hiányos védelmi rendszerrel bír, ami két hónap elteltével fényintenzitástól fordítottan függő növekedésbeli elmaradásban is tükröződött.
- A Pq jelenlétében végzett gyökcsapdás ESR mérések eredményei egyértelműen és direkt módon bebizonyították, hogy a Pq a szenzitív növényhez hasonlóan a rezisztens növény kloroplasztiszába is bejut és fény hatására szuperoxid gyökök fokozott keletkezését váltja ki. Ráadásul a PqR növény levelében ez a fokozott gyökképződés huzamosan megfigyelhető volt, csak lassan csökkent az intenzitása, míg a szenzitív növényben gyorsan csökkeni kezdett jelezve, hogy ott Pq és fény jelenlétében az elektrontranszport lánc nagyon hamar működésképtelenné válik.
- Megállapíthatjuk, hogy a PqR betyárkóróban a Pq és fény hatására ugyan csak átmenetileg gátolja a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-fixációt, de elhúzódóan hátrányosan érinti az NPQ folyamatot. A csak lassan csökkenő oxidatív stressz – az elhúzódó szuperoxid gyök képződés és annak nyomán keletkező hidroxilgyökök és hidrogénperoxid – több órán át fokozottan igénybe veszik az antioxidáns

védőenzim rendszert, ami a megtermelt redukáló ágensek (NADPH, aszkorbát) jelentős részét felemészteti. Fel kell tételeznünk, hogy a PqR növényben Pq és fény hatására indukálódik valami eddig ismeretlen védőmechanizmus, amely lehetővé teszi a súlyos oxidatív stressz kivédését, amíg megtörténik a Pq eliminálása.

- A gázcsere mérések, a fluoreszcencia kioltás elemzése, a xantofill-ciklus kezdeti stimulációja és a mind között legközvetlenebb megközelítésnek tekinthető ESR spektroszkópia eredményei alapján egyaránt kijelenthetjük, hogy a Pq a kezelés legkorábbi szakaszában éppúgy behatol a paraquat-rezisztens betyárkóró biotípusok levelébe és megjelenik kloroplasztiszbeli hatóhelyén, mint a szenzitív növények esetében.

Feltételezem, hogy a paraquat rezisztencia mechanizmusa több elemből tevődhet össze, amelyek (1) a kissé korlátozott és fény stimulálta bejutás a kloroplasztiszbba, (2) a fokozottan igénybe vett antioxidáns enzimrendszer, antioxidáns molekulák, amelyek átmenetileg megvédik a membránrendszert, benne a fotoszintetikus apparátust a destruktációtól, miközben (3) indukálódnak azok a molekulák, amelyek konjugátumot képezhetnek a paraquattal, és/vagy transzporterként részt vehetnek a szekvesztrációs folyamatban, ezáltal hatástalanná teszik és/vagy eltávolítják a hatóhelyéről a paraquatot.



## 5. Következtetések

- I. Kétszikű gyomok AR (D1 mutáns) biotípusai esetében megfigyeltük, hogy a xantofill-ciklusban a fény indukálta ZEA képződés és ezzel együtt az NPQ folyamat részlegesen gátolt, amelyet az atrazin rezisztenciával kapcsolatos új pleiotropikus hatásként deklaráltunk.

Megállapítottuk, hogy a D1 mutáns biotípusokban feltehetően a lelassult fotoszintetikus elektron- és protontranszport és ez által a lumenbeli, a xantofill-ciklus és a qE szempontjából kulcsfontosságú protonálódási folyamatok kedvezőtlen alakulása okozhatja a xantofill-ciklus csökkent aktivitását, a csökkent qE kialakulást.

- II. Klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek segítségével jellemeztük a kétszikű AR gyom biotípusok nagyobb fényérzékenységét. Megállapítottuk, hogy ennek, a kisebb bioprodukciónak és a csökkent kompetíciós képességnek a háttérében az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosulásának és a nem-fotokémiai energia disszipáció kedvezőtlen arányeltolódása áll.

Feltételezzük, hogy az AR növényben az elnyelt fényenergia energia rosszabb fotokémiai hasznosulása és a kimutathatóan csökkent energia disszipáció folytán nagyobb mennyiségben keletkező toxikus fotoproduktumok fokozottan igénybe veszik az antioxidáns védőenzim rendszert és kiváltják a D1 protein nagyobb sebességű lebomlását és helyreállítását (turnover-ét). Mindezen folyamatok fokozottan fogyasztják az AR növény levelében termelt redukáló ágens készletet és a nagyobb intenzitású *de novo* fehérjeszintézis is tartósan nagyobb mértékben használja föl a fotoszintetikusan begyűjtött szerves szénkészletet. Ez okozhatja végül – különösen a magasabb hőmérsékleten a D1 protein mutánsnál megfigyelt gátolt nettó fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-asszimilációval párosulva – az AR növények gyengébb bioprodukcióját, csökkent kompetíciós képességét.

- III. Megfigyeltük, hogy a Pq a szenzitív (vad) betyárkóró biotípusban fény jelenlétében kevesebb, mint 10 perc alatt tönkreteszi a CO<sub>2</sub>-fixációs mechanizmust és 30 perc elteltével a fotoszintetikus O<sub>2</sub>-fejlődés is megszűnik. Kimutattuk, hogy az extrém ZEA képződés ellenére a vad biotípusban az NPQ és annak qE komponense már 15 perc elteltével csökkenni kezd.

A fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-fixáció és O<sub>2</sub>-fejlődés korai gátlódása, az irreverzibilis violaxantin de-epoxidáció és az NPQ kialakulás ezzel ellentétes gátlódása együttesen a tilakoid membránok súlyos és megfordíthatatlan károsodására utalnak a Pq-kezelt szenzitív növényben.

- IV. A PqR betyárkóró esetében ESR technikával közvetlen módon kimutattuk, hogy a Pq huzamosan felfokozza a szuperoxid gyök termelődését. Megállapítottuk, hogy a fotoszintetikus CO<sub>2</sub>-fixáció és O<sub>2</sub>-fejlődés, szinkronban a klorofill fluoreszcencia alapján számított fotokémiai fényhasznosítási paraméterekkel ( $qP$  és  $\Delta F/F_m'$ ) Pq jelenlétében egyaránt átmeneti gátlást szenvedett a PqR betyárkóró levelében. Azt is kimutattuk, hogy Pq jelenlétében a ZEA képződés 15 perc elteltével extrém módon gátlódik. Megfigyeltük a Pq-kezelt PqR növény fényintenzitástól fordítottan függő, csökkent növekedését is.

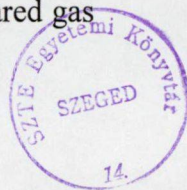
A szuperoxid gyök fokozott termelődésének kimutatása a Pq-kezelt PqR betyárkóróban minden eddigénél közvetlenebb bizonyíték arra, hogy a Pq a PqR növényben is bejut kloroplasztiszbeli hatóhelyére. A xantofill-ciklus kezdeti stimuláció utáni tartós gátoltságának elfogadható magyarázata például az antioxidáns védőmechanizmusok túlterheltségéből adódó permanens aszkorbáthiány lehet, ami egyben a megfigyelt növekedésgátlást is megmagyarázhatja a Pq-kezelt rezisztens növény esetében.

## Summary

Photoprotection of photosynthesis is a balancing act. Thermal dissipation and alternative electron transport pathways, together with changes in antenna size and overall photosynthetic capacity, help to balance light absorption and utilization in the constantly changing natural environment. The generation of reactive oxygen species is balanced by the capacity of antioxidant systems. The capacity for repair must match the damage not prevented by other photoprotective processes. Multiple, partially redundant mechanisms working in concert help to prevent net photooxidative damage that results from generation of reactive molecules through photosynthesis. The redundancy is not surprising if considered how critical photoprotection is for fitness and survival of algae and plants in most environments. Indeed, many of the molecules and enzymes acting in photoprotection have roles in more than one photoprotective mechanism. For example, xanthophylls are parts of both thermal dissipation and quenching of  $^1\text{O}_2$ , whereas SOD and APX enzymes scavenge reactive oxygen species while maintaining electron transport via the water-water cycle.

Atrazine resistant plants are known to have less competitiveness and biomass production. However, this cannot be explained by the D1 point mutation alone and there might be yet unknown physiological mechanisms in the background with possible practical and theoretical importance. There are certain well-known pleiotropic effects such as the slow  $Q_A \rightarrow Q_B$  electron transition, the enhanced membrane fluidity and restricted ability for thermal acclimation related to the changes in lipid composition or even the reduced zeaxanthin formation found and studied in our laboratory.

Within the frame of the research program related to wild and D1 protein (atrazine-resistant, AR) mutants intact plants, detached leaves or leaf discs of *Amaranthus retroflexus* L. (pigweed), *Chenopodium album* L. (goosefoot), *Epilobium adenocaulon* Hausskn. (willowherb), *Erigeron canadensis* L. (horseweed), *Senecio vulgaris* L. (common groundsel) and *Solanum nigrum* L. (black nightshade) were used for the experiments. During experiments with paraquat attached and detached leaves or leaf discs of the wild, paraquat-resistant (PqR) and paraquat-atrazine co-resistant (PqAR) biotypes of *Erigeron canadensis* L. (horseweed) were examined. Experiments were conducted by using measurements of photosynthetic  $\text{CO}_2$ -assimilation with infrared gas





analysers and O<sub>2</sub>-evolution in leaf disc oxygen electrode, chlorophyll *a* fluorescence induction with pulse amplitude modulated systems, separation of carotenoids by reversed phase HPLC and spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids.

**Observations related to the D1 protein mutant weed biotypes:**

- An equivalent level of the net photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation per leaf area unit was observed in every pair of wild and D1 mutant biotypes in C3 weeds, while there was a decreased photosynthetic activity in the C4 *A. retroflexus*. There were, however, also differences in CO<sub>2</sub>-assimilation between the wild and D1 mutant biotypes of *C. album* and *S. vulgaris* when compared on a total chlorophyll basis and the difference was even greater between *A. retroflexus* biotypes.
- A strong negative effect of high temperature on photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation of the D1 mutant of *S. nigrum* was revealed compared to the wild biotype which may be related to the low biomass production of these mutants in nature. There was no stomatal limitation behind this phenomenon, so it might be caused by a lowered Rubisco activity or decreased rate of RuBP regeneration.
- As a general phenomenon, there was a reduced rate of PSII linear electron transport, a low efficiency of both the photochemistry and the non-photochemical quenching calculated from *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements in the D1 protein mutants.
- The D1 mutant biotypes were found more sensitive to photoinhibition than the wild biotypes as reflected by the photosensitivity index ((1-qP)/NPQ). It means that the balance between the photochemical and non-photochemical utilization processes shifted to a wrong direction in the AR plants.
- Application of the energy allocation model to the wild and D1 protein mutant biotypes well mirrored the decreased photochemical performance of the D1 protein mutant (atrazine resistant) biotypes. The dissipative part in some species, however, showed discrepancy to the calculated NPQ values.
- The characteristic shade type shift in the chlorophyll *a/b* ratio was observed in all AR biotypes. There was no systematic difference in the xanthophyll cycle pool sizes between the two biotypes.

- According to the detailed carotenoid measurements on C3 dicot weeds having D1 protein mutant biotypes, a 30% decreased de-epoxidation capability can be generalized in the mutants relative to the wild types. This may partially explain the deficit of NPQ processes also generally observed in these AR biotypes.
- Experiments with addition of exogenous ascorbate as a cofactor of the xanthophyll cycle de-epoxidation activity showed that ascorbate is not the obvious and general limiting factor behind the partial inhibition of de-epoxidation and NPQ development in D1 mutants. It was also indirectly excluded when these differences between the two biotypes disappeared in the presence of paraquat.

We suggest that in the atrazine resistant plants – possibly due to the less effective photochemistry and, in addition, the lowered energy dissipation process – there are enhanced levels of toxic photoproducts representing a great demand for antioxidative defence and causing a high turnover of D1 protein. All these processes are consuming reductants at a high rate in the leaves of atrazine resistant plants and a high part of photosynthetic carbon gain will be used during enhanced *de novo* protein synthesis. These phenomena – especially when accompanied by a high temperature induced inhibition of net CO<sub>2</sub>-assimilation found in the D1 protein mutant – may result in less biomass production and low competitiveness of atrazine resistant plants.

#### **Observations on the effects of Pq and on PqR horseweed:**

- A complete breakdown of photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation was revealed in the wild and atrazine resistant biotypes of *E. canadensis* in the presence of paraquat and light within 10 min. It was proved to be light dependent but quickly performed even under mild light conditions (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR). In the leaves of the paraquat resistant biotype, however, the photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation started to recover within an hour after a transient inhibition.
- It was established that paraquat plus light caused an extreme and irreversible de-epoxidation just slightly depending on light intensity in susceptible plants. There might be an unusually high degree of lumen acidification and a quickly and irreversibly destroyed membrane structure in the background.

- There was only, however, a transient paraquat-induced de-epoxidation effect in the leaves of paraquat resistant horseweed during the first 30 min followed by an unexpected rise in the epoxidation index above the level of the non-treated light control leaves. NPQ was in good correlation with the epoxidation index. There might be a long lasting ascorbate deficit in the background and the deficient defence system in the paraquat treated paraquat resistant plant resulted in a retarded and inversely light dependent growth after two months.
- Results of electron spin resonance measurements with radical trapping confirmed obviously and directly that paraquat – similarly to the susceptible plants – can penetrate into the chloroplasts of paraquat resistant *E. canadensis* causing enhanced generation of superoxide radicals. In addition, it was a longer lasting phenomenon in the paraquat resistant plant compared to the wild biotype. The quick relaxation of paraquat-induced superoxide generation in susceptible plants may indicate the early destruction of the photosynthetic electron transport chain.
- We can conclude that in the paraquat treated and illuminated paraquat resistant *E. canadensis* – although the photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation will only be inhibited transiently – there is an extended limitation in NPQ formation. The prolonged oxidative stress – as reflected by the slowly decreasing superoxide level – will exhaust the reductant (NADPH, ascorbate) pools. We have to suppose some yet unknown defence mechanism in paraquat resistant plants allowing the prevention of membrane damage against an extreme oxidative stress and the elimination of paraquat.
- All the gas exchange measurements, the fluorescence quenching analysis, the initial stimulation of the xanthophyll cycle and the results of electron spin resonance spectroscopy measurements (as the most direct evidence) proved that paraquat can also reach its site of action in the chloroplast of paraquat resistant plants during the initial phase of paraquat treatment.

The mechanism of resistance to paraquat might comprise more than one element, namely (1) a slightly limited but light stimulated uptake and entrance into the chloroplast, (2) an antioxidant enzyme system and antioxidant molecules temporarily defending the membrane system including the photosynthetic apparatus against



destruction, while (3) synthesis of special molecules may be induced in order to bind paraquat in an inactive form or to act as transporters during sequestration processes eliminating paraquat from the site of action.

## Conclusions

- I. A partially inhibited light-induced zeaxanthin formation and reduced NPQ (qE) process was observed and generalized as a new pleiotropic effect of atrazine-resistance in the D1 protein Ser<sub>264</sub>→Gly mutants of dicot weeds.

This limited xanthophyll cycle activity can be explained by the lowered photosynthetic electron transport rate in the D1 mutants causing disadvantageous alterations in key protonation processes in the chloroplast lumen adversely affecting the violaxanthin de-epoxidation and qE build-up.

- II. A higher light sensitivity of D1 protein mutants (atrazine resistant biotypes) of dicot weeds was found and characterized by using chlorophyll fluorescence induction parameters. An unfavourable shift in the ratio of photochemical to non-photochemical utilization of absorbed light energy was also detected in the D1 mutants having reduced growth.

It is supposed that the lower efficiency of photochemistry together with the decreased energy dissipation capacity in D1 mutant plants may result in a highly exploited enzymatic antioxidant defence system and a higher D1 protein turnover. All these processes are consuming reductants at an increased rate in the leaves of AR plants and a great part of photosynthetic carbon gain will be used during enhanced *de novo* protein synthesis. These phenomena – especially when accompanied by a high temperature induced inhibition of net CO<sub>2</sub>-assimilation found in the D1 protein mutant – may result in less biomass production and low competitiveness of atrazine resistant plants.

- III. It was revealed that paraquat in the paraquat susceptible (wild) biotype of *E. canadensis* may disrupt CO<sub>2</sub>-fixating mechanisms within less than 10 min and the photosynthetic O<sub>2</sub>-evolution will be completely inhibited after 30 min. Contrary to

the extreme zeaxanthin formation in susceptible plants in the presence of paraquat, the NPQ and qE formation started to decrease after 15 min.

The early inhibition of photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation and O<sub>2</sub>-evolution, the irreversible violaxanthin de-epoxidation together with the decline of NPQ indicate a serious and irreversible tilakoid membrane damage in the paraquat-treated susceptible plants.

- IV. Paraquat induced a permanently enhanced level of superoxide radicals in leaves of paraquat resistant *E. canadensis* as directly revealed by ESR. Transient inhibition of photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation and O<sub>2</sub>-evolution, together with similar temporary changes of light utilization related chlorophyll fluorescence parameters (qP and  $\Delta F/F_m'$ ) were recorded in paraquat-treated resistant plants. Zeaxanthin formation was inhibited after 15 min and an inversely light intensity dependent, reduced growth was also observed.

Detection of an enhanced superoxide generation in leaves of paraquat-treated resistant plants gives the so far most direct evidence of the penetration of paraquat to its site of action in the resistant plant's chloroplast. Inhibition of the xanthophyll cycle after an initial induction may be explained by a permanent ascorbate depletion due to the overloaded defence system which might also explain the retarded growth of paraquat-treated resistant plants.

## **Szakirodalmi hivatkozások**

- Adams, W.W., III & Demmig-Adams, B. (1992) Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* 186: 390-398.
- Adams, W.W., III & Demmig-Adams, B. (1994) Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiol. Plant.* 92: 451-458.
- Adams, W.W., III & Demmig-Adams, B. (1995) The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiatschovicus* in winter. *Plant Cell Environ.* 18: 117-127.
- Adams, W.W., III, Volk, M., Hoehn, A. & Demmig-Adams, B. (1992) Leaf orientation and response of the xanthophyll cycle to incident light. *Oecologia* 90: 404-410.
- Adams, W.W., III, Hoehn, A. & Demmig-Adams, B. (1995a) Chilling temperatures and the xanthophyll cycle: a comparison of warm-grown and overwintering spinach. *Austral. J. Plant Physiol.* 22: 75-85.
- Adams, W.W., III, Demmig-Adams, B., Verhoeven, A.S. & Barker, D.H. (1995b) „Photoinhibition” during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Austral. J. Plant Physiol.* 22: 261-276.
- Allen, J.F. (1995a) Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol. Plant.* 93: 196-205.
- Allen, R.D. (1995b) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1054.
- Allen, R.D., Webb, R.P. & Schake, S.A. (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 473-479.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. & Cramer, C.L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100: 224-233.
- Anderson, J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 93-136.
- Anderson, J.M. & Andersson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 13: 351-355.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. & Goodchild, D.J. (1988) Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Austral. J. Plant Physiol.* 15: 11-26.
- Anderson, J.W., Foyer, C.H. & Walker, D.A. (1983) Lightdependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. *Planta* 158: 442-450.
- Anderson, J.M., Park, Y.-I. & Chow, W.S. (1997) Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.* 100: 214-223.
- Anderson, J.M., Park, Y.-I. & Chow, W.S. (1998) Unifying model for the photoinactivation of Photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis. *Photosynth. Res.* 56: 1-13.
- Anderson, I.C. & Robertson, D.S. (1960) Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiol.* 35: 531-534.
- Andersson, B. & Barber, J. (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: *Photosynthesis and the Environment*. (NR Baker, ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 101-121.



- Aro, E.-M., Virgin, I. & Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Duval, J.-C. (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60: 237-243.
- Asada, K. (1994a) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. (C.H. Foyer & P.M. Mullineaux, eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 77-104.
- Asada, K. (1994b) Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. (N.R. Baker, J.R. Bowyer, eds.) BIOS Sci. Publ., Oxford, pp. 129-142.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Asada, K. & Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Topics in Photosynthesis* (D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J. Arntzen, eds.), Vol. 9. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80890-6, pp. 227-288.
- Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A. & Horton, P. (2002) In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16331-16335.
- Barber, J. & Andersson, B. (1992) Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66.
- Baroli, I. & Melis, A. (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198: 640-646.
- Baroli, I. & Melis, A. (1998) Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205: 288-96.
- Baroli, I. & Niyogi, K.K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 1385-1394.
- Bartoli, C., Pastori, G. & Foyer, C.H. (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* 123: 335-343.
- Bassi, R. & Dainese, P. (1992) A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. *Eur. J. Biochem.* 204: 317-326.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. & Marquardt, J. (1993) Carotenoid-binding proteins of Photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 212: 297-303.
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D. & Sardonà, D. (1999) Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound in multiple sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10056-10061.
- Beck, E., Burkert, A. & Hofman, M. (1983) Uptake of L-ascorbate by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 73: 41-45.
- Bendall, D.S. & Manasse, R.S. (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 23-38.
- Berversdorf, W.D., Hume, D.J. & Donnelly-Vanderloo, M.J. (1988) Agronomic performance of triazine-resistant and susceptible reciprocal spring canola hybrids. *Crop Sci.* 28: 932-934.
- Bhaya, D. & Jagendorf, A.T. (1984) Optimal conditions for translation by thylakoid-bound polysomes from pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 75: 832-838.

- Biehler, K. & Fock, H. (1996) Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiol.* 112: 265-272.
- Bilger, W. & Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-185.
- Bilger, W. & Björkman, O. (1991) Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 184: 226-234.
- Bilger, W. & Björkman, O. (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 193: 238-246.
- Bilger, W., Björkman, O. & Thayer, S.S. (1989) Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol.* 91: 542-551.
- Björkman, O. (1981) Responses to different quantum flux densities. In: *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment*, (O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 57-107.
- Björkman, O. (1987) High irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. In: *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins, J., ed.), Vol. 4, Martinus Nijhoff: Dordrecht, The Netherlands, pp. 11-18.
- Björkman, O. & Demmig, B. (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Björkman, O. & Demmig-Adams, B. (1994) Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. In: *Ecophysiology of Photosynthesis* (Schulze, E.-D. & Caldwell, M.M., eds.) Springer, Berlin, pp. 17-47.
- Björkman, O., Demmig-Adams, B. & Andrews, T.J. (1988) Mangrove photosynthesis: response to high-irradiance stress. *Austral. J. Plant Physiol.* 15: 43-61.
- Bowes, J., Crofts, A.R. & Arntzen, C.J. (1980) Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Arch. Biochim. Biophys.* 200: 303-308.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- Bratt, C.E., Arvidsson, P.-O., Carlsson, M. & Åkerlund, H.-E. (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* 45: 169-175.
- Brugnoli, E., Cona, A. & Lauteri, M. (1994) Xanthophyll cycle components and capacity for non-radiative energy dissipation in sun and shade leaves of *Ligustrum ovalifolium* exposed to conditions limiting photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41: 451-463.
- Bugos, R.C., Hieber, A.D. & Yamamoto, H.Y. (1998) Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J. Biol. Chem.* 273: 15321-15324.
- Burke, J.J., Wilson, R.F. & Swafford, J.R. (1982) Characterization of chloroplasts isolated from triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Brassica campestris* L. *Plant Physiol.* 70: 24-29.



- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P. & Nixon, P.J. (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* 17: 868–876.
- Caffari, S., Croce, R., Breton, J. & Bassi, R. (2001) The major antenna complex of Photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J. Biol. Chem.* 276: 35924–35933.
- Casteletti, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffari, S., Bassi, R. & Croce, R. (2003) The recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the Photosystem I antenna system. *Biochemistry* 42: 4226–4234.
- Chiang, G.G. & Dilley, R.A. (1987) Evidence for  $\text{Ca}^{2+}$ -gated proton fluxes in chloroplast thylakoid membranes:  $\text{Ca}^{2+}$  controls a localized to delocalized proton gradient switch. *Biochemistry* 26: 4911–4916.
- Chiang, G.G. & Dilley, R.A. (1989) Intact chloroplasts show  $\text{Ca}^{2+}$ -gated switching between localized and delocalized proton gradient energy coupling. *Plant Physiol.* 90: 1513–1523.
- Chiang, G.G., Wooten, D.C. & Dilley, R.A. (1992) Calcium-dependent interaction of chlorpromazine with the chloroplast 8-kilodalton  $\text{CF}_0$  protein and calcium gating of  $\text{H}^+$  fluxes between thylakoid membrane domains and the lumen. *Biochemistry* 31: 5808–5819.
- Chow, W.S. (1994) Photoprotection and photoinhibitory damage. In: *Adv. Mol. Cell. Biol.* Vol. 10 (E.E. Bittar & J. Barber, eds.), JAI Press, London, pp. 151–196.
- Conard, S.G. & Radosevich, S.R. (1979) Ecological fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* biotypes susceptible or resistant to atrazine. *J. Appl. Ecol.* 16: 171–177.
- Conklin, P.L., Pallanca, J.E., Last, R.L. & Smirnoff, N. (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant *vtc1*. *Plant Physiol.* 115: 1277–1285.
- Conklin, P.L., Williams, E.H. & Last, R.L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9970–9974.
- Conklin, P.L., Saracco, S.A., Norris, S.R. & Last, R.L. (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154: 847–856.
- Crimi, M., Dorra, D., Bosinger, C.S., Giuffra, E., Holzwarth, A.R. & Bassi, R. (2001) Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant Photosystem II antenna complex CP29. Effects of zeaxanthin, pH and phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 268: 260–267.
- Croce, R., Canino, G., Ros, F. & Bassi, R. (2002) Chromophore organization in the higher-plant Photosystem II antenna protein CP26. *Biochemistry* 41: 7334–7343.
- Croce, R., Cinque, G., Holzwarth, A.R. & Bassi, R. (2002) The short absorption properties of carotenoids and chlorophylls in antenna complexes of higher plants. *Photosynth. Res.* 64: 221–231.
- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J. & Bassi, R. (1999a) The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHC II) from higher plants. *FEBS Lett.* 456: 1–6.
- Croce, R., Weiss, S. & Bassi, R. (1999b) Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* 274: 29613–29623.
- Crofts, A.R. & Yermak, C.T. (1994) A molecular mechanism for qE-quenching. *FEBS Lett.* 352: 265–270.
- Dainese, P., Hoyer-Hansen, G. & Bassi, R. (1990) The resolution of chlorophyll *a/b* binding protein by a preparative method based on flat bed isoelectric focusing. *Photochem. Photobiol.* 51: 693–703.



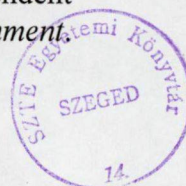
- Dainese, P., Marquardt, J., Pineau, B. & Bassi, R. (1992) Identification of violaxanthin and zeaxanthin binding proteins in maize Photosystem II. In: *Research in Photosynthesis* (Murata, N., ed.), Vol. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 287-290.
- Dall'Osto, L., Caffari, S. & Bassi, R. (2003) Isolation of two protein conformations of the antenna protein Lhcb5 with respectively high and low light harvesting efficiency. *in press*???
- Darkó, É., Váradi, Gy. & Lehoczki, E. (1996) Atrazine-resistant biotypes of *Conyza canadensis* have altered fluorescence quenching and xanthophyll cycle pattern. *Plant Physiol. Biochem.*, 34: 843-852.
- Darkó, É., Váradi, Gy., Lemoine, Y. & Lehoczki, E. (2000) Defensive strategies against high-light stress in wild and D1 protein mutant biotypes of *Erigeron canadensis*. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 325-333.
- Darmency, H. & Pernes, J. (1989) Agronomic performance of a triazine-resistant foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.). *Weed Res.* 29: 147-150.
- Dau, H. (1994) Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.* 60: 1-23.
- Davies, W.J. & Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soils. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 55-76.
- de Jesus, M.D., Tabatabai, F. & Chapman, D.J. (1989) Taxonomic distribution of copperzinc superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. *J. Phycol.* 25: 767-772.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W. III (1992a) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W. III (1992b) Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant Cell Environ.* 15: 411-419.
- Demmig-Adams B. & Adams, W.W. III (1993a) The xanthophyll cycle. In: *Carotenoids in Photosynthesis*. (Young, A. & Britton, G., eds.) Chapman & Hall, London, pp. 206-251.
- Demmig-Adams B. & Adams, W.W. III (1993b) The xanthophyll cycle. In: *Antioxidants in Higher Plants*. (Alscher, R.G. & Hess, J.L., eds.) CRC Boca Raton, FL, pp. 91-110.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W. III (1996) The role of xanthophyll cycle in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1: 21-26.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III, Heber, U., Neimanis, S., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.-C., Bilger, W. & Björkman, O. (1990) Inhibition of zeaxanthin formation and rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol.* 92: 293-301.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Logan, B.A. & Verhoeven, A.S. (1995) Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible PSII efficiency in plants acclimated to light stress. *Austral. J. Plant Physiol.* 22: 249-260.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R. & Verhoeven, A.S. (1996a) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.* 98: 253-264.

- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. & Grace, S.C. (1997) Physiology of light tolerance in plants. *Hort. Reviews* 18: 215-246.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. & Adams, W.W. III. (1996b) *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: 403-412.
- Demmig-Adams, B., Moeller, D.L., Logan, B.A. & Adams, W.W. III. (1998) Positive correlation between levels of retained zeaxanthin C antheraxanthin and degree of photoinhibition in shade leaves of *Schefflera arboricola* (Hayata) Merrill. *Planta* 205: 367-374.
- Demmig, B., Cleland, R.E. & Björkman, O. (1987a) Photoinhibition, 77K chlorophyll fluorescence quenching and phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll-protein complex of photosystem II in soybean leaves. *Planta* 172: 378-385.
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C (1987b) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84: 218-224.
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C (1988) Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* 87: 17-24.
- De Prado, R., Dominguez, C., Rodriguez, I. Tena, M. (1992) Photosynthetic activity and chloroplast structural characteristics in triazine-resistant biotypes of three weed species. *Physiol. Plant* 84: 477-485.
- Devine, M.D. & Shimabukuro, R.H. (1994) Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants. Biology and Biochemistry.* (S.B. Powles & J.A.M. Holtum, eds.) Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 141-169.
- Dilley, R.A. (1991) Energy coupling in chloroplasts: a calcium-gated switch controls proton fluxes between localized and delocalized proton gradients. *Curr. Top. Bioenerg.* 16: 265-318.
- Dilley, R.A. (2004) On why thylakoids energize ATP formation using either delocalized or localized proton gradients – a Ca<sup>2+</sup> mediated role in thylakoid stress responses. *Photosynth. Res.* 80: 245-263.
- Dilley, R.A., Theg, S.M. & Beard, W.A. (1987) Membrane-proton interactions in chloroplast bioenergetics: Localized proton domains. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 348-389.
- Duckham, S.C., Linforth, R.S.T. & Taylor, I.B. (1991) Absciscic-acid-deficient mutants at the *aba* gen locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant Cell Environ.* 14: 601-606.
- Ducruet, J. & Lemoine, Y. (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.* 26: 419-429.
- Dulai, S., Molnar, I. & Lehoczki, E. (1998) Effects of growth temperatures of 5 and 25°C on long-term responses of Photosystem II to heat stress in atrazine-resistant and susceptible biotypes of *Erigeron canadensis*. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 145-153.
- Dulai, S., Molnár, I., Péli, E. & Lehoczki, E. (1999) Short-term responses of PS II to heat stress in cold-acclimated atrazine-resistant and susceptible biotypes of *Erigeron canadensis* (L.). *Z. Naturforsch.* 54c: 665-670.
- Elliott, J.R. & Peirson, D.R. (1983) Growth analysis of atrazine-resistant and atrazine-sensitive biotypes of *Chenopodium album*. *Ann. Bot.* 51: 727-739.
- Escoubas, J.-M., Lomas, M., LaRoche, J. & Falkowski, P.G. (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10237-10241.

- Eskling, M., Arvidsson, P.-O. & Åkerlund, H.-E. (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* 100: 806–816.
- Eskling, M. & Åkerlund, H.-E. (1998) Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light. *Photosynth. Res.* 57: 41–50.
- Ewy, R.G. & Dilley, R.A. (2000) Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 122: 583–595.
- Falbel, T.G., Staehelin, A. & Adams, W.W., III (1994) Analysis of xanthophyll cycle carotenoids and chlorophyll fluorescence in light intensity-dependent chlorophyll-deficient mutants of wheat and barley. *Photosynth. Res.* 42: 191–202.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S. & Berry, J.A. (1990) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78–90.
- Foote, C.S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In *Free Radicals in Biology*. (W.A. Pryor, ed.), New York Academic, 2: 85–133.
- Formaggio, E., Cinque, G. & Bassi, R. (2001) Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *J. Mol. Biol.* 314: 1157–1166.
- Forti, G. & Jagendorf, A.T. (1961) Photosynthetic phosphorylation in the absence of redox dyes: oxygen and ascorbate effects. *Biochim. Biophys. Acta* 54: 322–330.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. & Kunert, K.J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507–523.
- Foyer, C.H., Dujardin, M. & Lemoine, Y. (1989) Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate-glutathione cycles to changes in irradiance, photoinhibition and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 751–760.
- Foyer, C.H., Furbank, R., Harbinson, J. & Horton, P. (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth. Res.* 25: 83–100.
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25.
- Foyer, C.H. & Harbinson, J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. (C.H. Foyer & P.M. Mullineaux, eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1–42.
- Foyer, C.H. & Lelandais, M. (1996) A comparison of the relative rate of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J. Plant Physiol.* 148: 391–398.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. & Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696–717.
- Foyer, C.H., Rowell, J. & Walker, D. (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157: 239–244.
- Frank, H.A. & Cogdell, R.J. (1993) The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In: *Carotenoids in Photosynthesis*, (A. Young & G. Britton, eds.), Chapman & Hall, London, pp. 252–326.
- Frank, H.A. & Cogdell, R.J. (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63: 257–264.
- Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. & Wasielewski, M.R. (1994) Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41: 389–395.



- Frank, H.A., Farhoosh, R., Gebhard, R., Lugtenburg, J., Gosztola, D. & Wasielewski, M.R. (1993) The dynamics of the S1 excited states of carotenoids. *Chem. Phys. Lett.* 207: 88-92.
- Fridovich, I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257.
- Fryer, M.J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15: 381-392.
- Fuerst, E.P. & Norman, M.A. (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* 39: 458-464.
- Gawronski, S.W., Sugita, M. & Sugiura, M. (1992) Mutation of *psbA* gene in herbicide-resistant population of *Erigeron canadensis*. In: *Research in Photosynthesis*, Murata, N., ed., Vol. III, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 405-407.
- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Gillham, D.J. & Dodge, A.D. (1986) Hydrogen-scavenging systems within pea chloroplasts: A quantitative study. *Planta* 167: 246-251.
- Gilmore, A.M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* 99: 197-209.
- Gilmore, A.M. (2001) Xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II: mechanistic insights gained from *Arabidopsis thaliana* L. mutants that lack violaxanthin deepoxidase activity and/or lutein. *Photosynth. Res.* 67: 89-101.
- Gilmore, A.M. & Björkman, O. (1994) Adenine nucleotides and the xanthophyll cycle in leaves. II. Comparison of the effects of CO<sub>2</sub>- and temperature-limited photosynthesis on Photosystem II fluorescence quenching, the adenylate energy charge and violaxanthin de-epoxidation in cotton. *Planta* 192: 537-544.
- Gilmore, A.M., Hazlett, T.L. & Govindjee (1995) Xanthophyll cycle dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 92: 2273-2277.
- Gilmore, A.M., Shinkarev, V.P., Hazlett, T.L. & Govindjee (1998) Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids. *Biochemistry* 37: 13582-13593.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1990) Zeaxanthin formation in qE-inhibited chloroplasts. In: Baltscheffsky, M., (ed.) *Current Research in Photosynthesis*, Vol. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 495-498.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1991) Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. *Plant Physiol.* 96: 635-643.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1992) Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching mediated by ATP. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 89: 1899-1903.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1993a) Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* 35: 67-78.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1993b) Biochemistry of xanthophyll-dependent nonradiative energy dissipation. In: *Photosynthetic Responses to the Environment*.





- (Yamamoto, H.Y. & Smith, C.M., eds.) Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD, pp. 162-165.
- Goloubinoff, P., Edelman, M. & Hallick, R.B. (1984) Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucl. Acid Res.* 12: 9489-9496.
- Gounaris, K. & Barber, J. (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature. *Trends Biochem. Sci.* 8: 378-381.
- Grace, S.C. & Logan, B.A. (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broadleaved evergreen species. *Plant Physiol.* 112: 1631-1640.
- Green, B.R. & Durnford, D.G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 685-714.
- Gressel, J. (1985) Herbicide tolerance and resistance; alteration of site of activity. In: *Weed Physiology*, Duke, S.O., ed., Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 159-189.
- Gressel, J. & Ben-Sinai, G. (1985) Low intraspecific competitive fitness in a triazine-resistant, nearly nuclear-isogenic line of *Brassica napus*. *Plant Sci.* 38: 29-32.
- Greenstock, C.L. & Miller, R.W. (1975) The oxidation of Tiron by superoxide anion. Kinetics of the reaction in aqueous solutions and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396: 11-16.
- Gronwald, J.W. (1994) Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants. Biology and Biochemistry*. (S.B. Powles & J.A.M. Holtum, eds.) Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 27-60.
- Grotz, B., Molnár, P., Stransky, H. & Hager, A. (1999) Substrate specificity and functional aspects of violaxanthin-de-epoxidase, an enzyme of the xanthophyll cycle. *J. Plant Physiol.* 154: 437-446.
- Gruszczyk, W.I. (1995) Different aspects of protective activity of the xanthophyll cycle under stress conditions. *Acta Physiol. Plant.* 17: 145-152.
- Gruszczyk, W.I. & Krupa, Z. (1993a) LHC II preparation exhibits properties of a zeaxanthin epoxidase. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 17: 291-292.
- Gruszczyk, W.I. & Krupa, Z. (1993b) LHC II, the major light-harvesting pigment-protein complex is a zeaxanthin epoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 97-101.
- Gruszczyk, W.I. & Strzalka, K. (1991) Does the xanthophyll cycle take part in the regulation of fluidity of the thylakoid membrane? *Biochim. Biophys. Acta* 1060: 310-314.
- Hager, A. (1969) Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin- --- Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* 89: 224-243.
- Hager, A. (1975) Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88: 27-44.
- Hager, A. (1980) The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In: *Pigments in Plants*. (Czygan, F.-C., ed.) Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 57-79.
- Hager, A. & Holocher, K. (1994) Localization of the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581-589.
- Hager, A. & Perz, H. (1970) Veränderung der Lichtabsorption eines Carotinoids im Enzym(De-epoxidase)-Substrat(violaxanthin)-komplex. *Planta* 93: 314-322.
- Hall, L.M., Holtum, J.A.M. & Powles, S.B. (1994) Mechanism responsible for cross resistance and multiple resistance. In: *Herbicide Resistance in Plants. Biology and*

- Biochemistry*. (S.B. Powles & J.A.M. Holtum, eds.) Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 243-261.
- Hart, J.J. & Stemler, A. (1990) High light-induced reduction and low light-enhanced recovery of photon yield in triazine-resistant *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 94: 1301-1307.
- Havaux, M. (1989) Comparison of atrazine-resistant and -susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* L: Effect of high and low temperatures on the *in vivo* photosynthetic electron transfer in intact leaves. *J. Exp. Bot.* 40: 849-854.
- Havaux, M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 3: 147-151.
- Havaux, M. & Niyogi, K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8762-8767.
- Havaux, M. & Tardy, F. (1995) Short-term adaptive responses of photosynthesis to elevated temperatures and strong light. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. IV, (P. Mathis, ed.), Kluwer, Dordrecht, pp. 777-782.
- Havaux, M., Tardy, F., Ravenel, J., Chanu, D. & Parot, P. (1996) Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: influence of the xanthophyll content. *Plant Cell Environ.* 19: 1359-1368.
- Heber, U., Bligny, R., Streb, P. & Douce, R. (1996) Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C<sub>3</sub> plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta* 109: 307-315.
- Heber, U., Miyake, C., Mano, J., Ohno, C. & Asada, K. (1996) Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. *Plant Cell Physiol.* 37: 1066-1072.
- Heber, U. & Walker, D. (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* 100: 1621-1626.
- Hideg, É., Mano, J., Ohno, C. & Asada, K. (1997) Increased levels of monodehydroascorbate radical in UV-B-irradiated broad bean leaves. *Plant Cell Physiol.* 38: 684-690.
- Hideg, É., Spetea, C. & Vass, I. (1995) Superoxide radicals are not the main promoters of acceptor-side-induced photoinhibitory damage in spinach thylakoids. *Photosynth. Res.* 46: 399-407.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C., Verhoeven, A.S. & Yamamoto, H.Y. (2004) Overexpression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding. *Planta* 214: 476-483.
- Hieber, A.D., Kawabata, O. & Yamamoto, H.Y. (2004) Significance of the lipid phase in the dynamics and functions of the xanthophyll cycle as revealed by PsbS overexpression in tobacco and *in vitro* de-epoxidation in monogalactosyldiacylglycerol micelles. *Plant Cell Physiol.* 45: 92-102.
- Hirschberg, J. & McIntosh, L. (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science (Washington)* 224: 1346-1348.
- Hobbs, S.L.A. (1987) Comparison of photosynthesis in normal and triazine-resistant *Brassica*. *Can. J. Plant Sci.* 67: 457-466.
- Holt, J.S. (1988) Reduced growth, competitiveness, and photosynthetic efficiency of triazine-resistant *Senecio vulgaris* from California. *J. Appl. Ecol.* 25: 307-318.
- Holt, J.S. & Goffner, D.P. (1985) Leaf structure and function in triazine-resistant common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Plant Physiol.* 79: 699-705.



- Holt, J.S. & Radosevich, S.R. (1983) Differential growth of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes. *Weed Sci.* 31: 112-120.
- Holt, J.S., Radosevich, S.R. & Stemler, A.J. (1983) Differential efficiency of photosynthetic oxygen evolution in flashing light in triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio vulgaris* L. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 245-255.
- Holt, J.S., Stemler, A.J. & Radosevich, S.R. (1981) Differential light responses of photosynthesis by triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio vulgaris*. *Plant Physiol.* 67: 744-748.
- Holt, J.S. & Thill, D.C. (1994) Growth and productivity of resistant plants. In: *Herbicide Resistance in Plants. Biology and Biochemistry*. (S.B. Powles & J.A.M. Holtum, eds.) Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 299-316.
- Horton, P. & Ruban, A.V. (1994) The role of light-harvesting complex II in energy quenching. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. (N.R. Baker, J.R. Bowyer, eds.) BIOS Sci. Publ., Oxford, pp. 111-128.
- Horton, P., Ruban, A.V., Rees, D., Pascal, A.A., Noctor, G. & Young, A.J. (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC II chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett.* 292: 1-4.
- Horton, P., Ruban, A.V. & Walters, R.G. (1994) Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiol.* 106:415-420.
- Horton, P., Ruban, A.V. & Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Huner, N.P.A., Öquist, G. & Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3: 224-230.
- Hurry, V., Anderson, J.M., Badger, M.R. & Price, G.D. (1996) Reduced levels of cytochrome *b6/f* in transgenic tobacco increases the excitation pressure on photosystem II without increasing the sensitivity to photoinhibition *in vivo*. *Photosynth. Res.* 50: 159-69.
- Ireland, C.R., Telfer, A., Covello, P.S., Baker, N.R. & Barber, J. (1988) Studies on the limitations to photosynthesis in leaves of the herbicide-resistant mutant of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 173: 459-467.
- Ivanov, B. & Edwards, G. (2000) Influence of ascorbate and the Mehler peroxidase reaction on non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in maize mesophyll chloroplasts. *Planta* 210: 765-774.
- Jahns, P. & Junge, W. (1990) Dicyclohexylcarbodiimide-binding proteins related to the short circuit of the proton-pumping activity of photosystem II identified as light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 193: 731-736.
- Jahns, P. & Mieke, B. (1996) Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198: 202-210.
- Jahns, P., Polle, A. & Junge, W. (1988) The photosynthetic water oxidase: its proton pumping activity is short-circuited within the protein by DCCD. *EMBO J.* 7: 589-594.
- Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, W. & Hobe, S. (2001) De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* 276: 22154-22159.
- Jansen, M.A.K., Hobe, J.H., Wesselius, J.C. & van Rensen, J.J.S. (1986) Comparison of photosynthetic activity and growth performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Chenopodium album*. *Physiol. Veg.* 24: 475-484.
- Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 4: 236-240.

- Jin, E.S., Yokthongwattana, K., Polle, J.E.W. & Melis, A. (2003) Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 132: 352-364.
- Jursinic, P.A. & Percy, R.W. (1988) Determination of the rate limiting step for photosynthesis in a nearly isonuclear rapeseed (*Brassica napus* L.) biotype resistant to atrazine. *Plant Physiol.* 88: 1195-1200.
- Kaiser, W.M. (1979) Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145: 377-382.
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. & Mullineaux, P. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light. *Plant Cell* 9: 627-640.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. & Mullineaux, P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657.
- Kato, M.C., Hikosaka, K. & Hirose, T. (2002) Leaf discs floated on water are different from intact leaves in photosynthesis and photoinhibition. *Photosynth. Res.* 72: 65-70.
- Khamis, S., Lamaze, T., Lemoine, Y. & Foyer, C. (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiol.* 94: 1436-1443.
- Kiddle, G., Pastori, G.M., Bernard, S., Pignocchi, C., Antoniow, J., Verrier, P.J., & Foyer, C.H. (2003) Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants & Redox Signalling* 5: 23-32.
- Knox, J.P. & Dodge, A.D. (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24: 889-96.
- Kozaki, A. & Takeba, G. (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.
- Krause, G. (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.* 74: 566-574.
- Kuroda, H., Inagaki, N. & Satoh, K. (1992) The level of stromal ATP regulates translation of the D1 protein in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 33: 33-39.
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N. & Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621.
- Lamborghini, M. (2002) Three dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll *a* and *b* protein complex from plant chloroplasts. *PhD Thesis*, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.
- Laszlo, J.A., Baker, G.A. & Dilley, R.A. (1984) Chloroplast thylakoid membrane proteins having buried amine buffering groups. *Biochim. Biophys. Acta* 765: 160-169.
- Laszlo, J.A., Millner, P.A. & Dilley, R.A. (1982) Light-dependent chemical modification of membrane proteins with carboxyl-directed reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 571-581.
- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugata, A. & Strzalka, D. (2002) Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur. J. Biochem.* 269: 4656-4665.
- Law, M.Y., Charles, S.A. & Halliwell, B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 210: 899-903.
- Lawlor, D.W. (1993) *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental approaches*, 2nd edn., Longman, London.

- LeBaron, H.M. (1991) Distribution and seriousness of herbicide-resistant weed infestations worldwide. In: *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. J.C. Caseley, G.W. Cussans & R.K. Atkin, eds., Oxford: Butterworth-Heinemann, pp. 27-43.
- Lee, H.-Y., Hong, Y.-N. & Chow, W.S. (2001) Photoinactivation of photosystem II and photoprotection by non-functional neighbours in *Capsicum annuum* L. leaves. *Planta* 212: 332-342.
- Lee, H.-Y., Hong, Y.-N. & Chow, W.S. (2002) Putative effects of pH in intra-chloroplast compartments on photoprotection of functional photosystem II complexes by photoinactivated neighbours and on recovery from photoinactivation in *Capsicum annuum* leaves. *Funct. Plant Biol.* 29: 607-619.
- Lehoczki, E., Pölös, E., Laskay, G. & Farkas, T. (1985) Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis*. *Plant Sci.* 42: 19-24.
- Lehoczki, E., Laskay, G., Gaál, I. & Szigeti, Z. (1992) Mode of action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Plant Cell Environ.* 15: 531-539.
- Leipner, J. (1998) Chilling-induced photooxidative stress and adaptation of defence systems in maize (*Zea mays* L.) leaves. *PhD Thesis*. Diss. ETZH No. 12680, Zürich.
- Leipner, J., Stamp, P. & Fracheboud, Y. (2000) Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta* 210: 964-969.
- Lemoine, Y., Dubacq, J.-P., Zabulon, G. & Ducruet, J.-M. (1986) Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and -susceptible biotypes of several plant species. *Can J. Bot.* 64: 2999-3007.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.G., Rosenquist, M., Jansson, S. & Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.
- Li, X.-P., Gilmore, A.M. & Niyogi, K.K. (2002a) Molecular and global time-resolved analysis of a *psbS* gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *J. Biol. Chem.* 277: 33590-33597.
- Li, X.-P., Phippard, A., Pasari, J. & Niyogi, K.K. (2002b) Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo*. *Funct. Plant Biol.* 29: 1131-1139.
- Li, X.-P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A.M. & Niyogi, K.K. (2002c) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15222-15227.
- Li, X.-P., Gilmore, A.M., Caffari, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D. & Niyogi, K.K. (2004) Regulation of Photosynthetic Light Harvesting Involves Intrathylakoid Lumen pH Sensing by the PsbS Protein. *J. Biol. Chem.* 279: 22866-22874.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods. Enzymol.* 148: 350-382.
- Lindahl, M., Yang, D.-H. & Andersson, B. (1995) Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a-b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur. J. Biochem.* 231: 503-509.
- Loewus, F.A. (1999) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochem.* 52: 193-210.
- Logan, B.A., Barker, D.H., Demmig-Adams, B. & Adams II, W.W. (1996) Acclimation of leaf carotenoid composition and ascorbate levels to gradients in the light environment within an Australian rainforest. *Plant Cell Environ.* 19: 1083-1090.



- Lovelock, C.E. & Clough, B.F. (1992) Influence of solar radiation and leaf angle on leaf xanthophyll concentrations in mangroves. *Oecologia* 91: 518-525.
- Lovelock, C.E. & Winter, K. (1996) Oxygendependent electron transport and protection from photoinhibition in leaves of tropical tree species. *Planta* 198: 580-587.
- Ma, Y.-Z., Holt, N.E., Li, X.-P., Niyogi, K.K. & Fleming, G.R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4377-4382.
- Mano, J., Ushimaru, T. & Asada, K. (1997) Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. *Photosynth. Res.* 53: 197-204.
- Mapson, L.W. (1962) Photo-oxidation of ascorbic acid in leaves. *Biochem. J.* 85: 360-369.
- Marrè, E., Arrigoni, O. & Rossi, G. (1959) Ascorbic acid and photosynthesis. II. Anaerobic photo-oxidation of ascorbic acid by chloroplast fragments and by whole chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 36: 56-64.
- Matsubara, S., Gilmore, A.M. & Osmond, C.B. (2001) Diurnal and acclimatory responses of violaxanthin and lutein epoxide in the Australian mistletoe *Amyema miquelii*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 793 - 800.
- Matsubara, S., Gilmore, A.M., Ball, M.C., Anderson, J.M. & Osmond, B. (2002) Sustained downregulation of Photosystem II in mistletoes during winter depression of photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* 29: 1157-1169.
- Maxwell, D.P., Laudenbach, D.E. & Huner, N.P.A. (1995) Redox regulation of light harvesting complex II and *cab* mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 109: 787-795.
- Mayer, M.P., Beyer, P. & Kleinig, H. (1990) Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoene desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L. *Eur. J. Biochem.* 191: 359-363.
- McCloskey, W.B. & Holt, J.S. (1990) Triazine resistance in *Senecio vulgaris* parental and nearly isonuclear backcrossed biotypes is correlated with reduced productivity. *Plant Physiol.* 92: 954-962.
- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65-77.
- Melis, A. (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1058: 87-106.
- Melis, A. (1999) Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci.* 4: 130-135.
- Merzlyak, M.N. & Hendry, G.A.F. (1994) Free radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* 102B: 459-471.
- Miyake, C. & Asada, K. (1992) Thylakoidbound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33: 541-553.
- Morales, F., Abadía, A., Belkhdja, R. & Abadía, J. (1994) Iron deficiency-induced changes in the photosynthetic pigment composition of field-grown pear (*Pyrus communis* L.) leaves. *Plant Cell Environ.* 17: 1153-1160.
- Morosinotto, T., Baronio, R. & Bassi, R. (2002) Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins *in vivo* and *in vitro* during operation of the xanthophyll cycle. *J. Biol. Chem.* 277: 36913-36920.
- Morosinotto, T., Caffari, S., Dall'Osto, L. & Bassi, R. (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plant.* 119: 347-354.

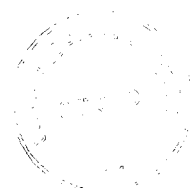
- Moya, I., Silvestri, M., Vallon, O., Cinque, G. & Bassi, R. (2001) Time-resolved fluorescence analysis of the Photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes. *Biochemistry* 40: 12552-12561.
- Munné-Bosch, S. & Allegre, L. (2002) Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett.* 524: 145-148.
- Müller, P., Li, X.-P. & Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P.L. & Niyogi, K.K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiol.* 128: 970-977.
- Neubauer, C. (1993) Multiple effects of dithiothreitol on nonphotochemical fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiol.* 103: 575-583.
- Neubauer, C. & Yamamoto, H.Y. (1994) Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynth. Res.* 39: 137-147.
- Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- Niyogi, K.K., Björkman, O. & Grossman, A.R. (1997a) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14162-14167.
- Niyogi, K.K., Björkman, O. & Grossman, A.R. (1997b) *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9: 1369-1380.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R. & Björkman, O. (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Noctor, G., Rees, D., Young, A. & Horton, P. (1991) The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, and trans-thylakoid pH gradient in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1057: 320-330.
- Norris, S.R., Barrette, T.R. & DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139-2149.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K. & Asada, K. (1995) Attachment of CuZn superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* 36: 565-573.
- Ohad, I., Keren, N., Zer, H., Gong, H., Mor, T.S., Gal, A., Tal, S. & Domovich, Y. (1994) Light-induced degradation of the photosystem II reaction centre D1 protein *in vivo*: an integrative approach. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. (N.R. Baker & J.R. Bowyer, eds.) BIOS Sci. Publ., Oxford, pp. 161-77.
- Ort, D.R., Ahrens, W.H., Martin, B. & Stoller, E.W. (1983) Comparison of photosynthetic performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. *Plant Physiol.* 72: 925-930.
- Orvar, B.L. & Ellis, B.E. (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J.* 11: 1297-1305.
- Osmond, C.B. (1981) Photorespiration and photoinhibition; some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 639: 77-98.

- Osmond, C.B. (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In: *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. (N.R. Baker & J.R. Bowyer, eds.) Bios Scientific, Oxford, pp. 1-24.
- Osmond, C.B. & Grace, S.C. (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 46: 1351-1362.
- Owens, T.G. (1994) Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. (N.R. Baker, J.R. Bowyer, eds.) BIOS Sci. Publ., Oxford, pp. 95-109.
- Öquist, G., Chow, W.S. & Anderson, J.M. (1992) Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186: 450-460.
- Pallanca, J.E. & Smirnoff, N. (2000) The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J. Exp. Bot.* 51: 669-674.
- Park, Y.-I., Anderson, J.M. & Chow, W.S. (1996a) Photoinactivation of functional photosystem II and D1-protein synthesis in vivo are independent of the modulation of the photosynthetic apparatus by growth irradiance. *Planta* 198: 300-9.
- Park Y-I, Chow WS, Osmond CB, Anderson JM. (1996b) Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of Photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* 50: 23-32.
- Park, Y.-I., Chow, W.S. & Anderson, J.M. (1995) Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401-11.
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signalling. *The Plant Cell* 15: 939-951.
- Pastori, G.M. & Trippi, V.S. (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.* 33: 957-961.
- Peter, G.F. & Thornber, J.P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant Photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266:16745-16754.
- Pfister, K. & Arntzen, C.J. (1979) The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide resistant weed biotypes. *Z. Naturforsch.* 34c: 996-1009.
- Pfündel, E. & Bilger, W. (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42: 89-109.
- Pfündel, E. & Dilley, R.A. (1993) The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 101: 65-71.
- Pfündel, E., Renganathan, M., Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. & Dilley, R.A. (1994) Intrathylakoid pH in isolated pea chloroplasts as probed by violaxanthin deepoxidation. *Plant Physiol.* 106: 1647-1658.
- Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Björkman, O. & DellaPenna, D. (1998) Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13324-13329.
- Polivka, T., Herek, J.L., Zigmantas, D., Åkerlund, H.-E. & Sundström, V. (1999) Direct observation of the (forbidden) S-1 state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4914-4917.



- Polivka, T., Zigmantas, D., Sundström, V., Formaggio, E., Cinque, G. & Bassi, R. (2002) Carotenoid S (1) state in a recombinant light harvesting complex of Photosystem II. *Biochemistry* 41: 439-450.
- Polle, A. (1997) Defense against photooxidative damage in plants. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, (J.G. Scandalios, ed.), Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY, pp. 623-666.
- Polyánka, H., Váradi, Gy. and Lehoczki, E. (2002) Photorespiration in D1 protein mutant weed biotypes with limited xanthophyll cycle capacities. *Acta Biol. Szeged.* 46 (3-4): 161-162.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 14-44.
- Pölös, E., Laskay, G., Szigeti, Z., Pataki, S. & Lehoczki, E. (1987) Photosynthetic properties and cross-resistance to some urea herbicides of triazine-resistant *Conyza canadensis* (L) Cronquist. *Z. Naturforsch.* 42c: 784-793.
- Prásil, O., Adir, N. & Ohad, I. (1992) Dynamics of photosystem II mechanism of photoinhibition and recovery processes. In: *The photosystems: structure, function and molecular biology*. (J. Barber, ed), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 295-348.
- Rautenkranz, A.A.F., Li, L., Machler, F., Martinoia, E. & Oertli, J.J. (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* cv. Gerbil) leaves. *Plant Physiol.* 106: 187-193.
- Rees, D., Young, A., Noctor, G., Britton, G. & Horton, P. (1989) Enhancement of the  $\Delta$ pH-dependent dissipation of excitation energy in spinach chloroplasts by light activation: correlation with the synthesis of zeaxanthin. *FEBS Lett.* 256: 85-90.
- Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U.-M., Carlberg, I., Andersson, B. & Aro, E.-M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 272: 30476-30482.
- Rock, C. & Zeevaart, J. (1991) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7491-7499.
- Rockholm, D.C. & Yamamoto, H.Y. (1996) Violaxanthin de-epoxidase: purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglycerid. *Plant Physiol.* 110: 697-703.
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J. & Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the Photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* 274: 10458-10465.
- Ruban, A.V., Young, A.J. & Horton, P. (1993) Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. Evidence for changes in the state of the light-harvesting system of photosystem II *in vivo*. *Plant Physiol.* 102: 741-750.
- Ruban, A.V., Young, A.J., Pascal, A.A. & Horton, P. (1994) The effects of illumination on the xanthophyll composition of the Photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 104: 227-234.
- Ruban, A.V., Pascal, A.A., Robert, B. & Horton, P. (2002) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.* 277: 7758-7789.
- Ryan, G.F. (1970) Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18: 614-616.
- Sager, R. & Zalokar, M. (1958) Pigments and photosynthesis in a carotenoid-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Nature* 182: 98-100.

- Sapozhnikov, D.I. & Bazhanova, N.V. (1958) A description of the light reaction in isolated chloroplasts. *Dokl. Akad. Nauk.* 120: 1141-1143.
- Sapozhnikov, D.I., Krasovskaya, T.A. & Mayevskaya, A.N. (1957) Changes observed in the relation between main carotenoids in the plastids of green leaves exposed to light. *Dokl. Akad. Nauk.* 113: 456-467.
- Schatz, G., Brock, H. & Holzwarth, A.R. (1988) Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II. *Biophys. J.* 54: 397-405.
- Schonfeld, M., Yaacoby, T., Michael, O. & Rubin, B. (1987) Triazine resistance without reduced vigor in *Phalaris paradoxa*. *Plant Physiol.* 83: 329-333.
- Schöner, S. & Krause, G.H. (1990) Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180: 383-389.
- Schreiber, U. & Neubauer, C. (1990) O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energisation and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25: 279-293.
- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62.
- Schuster, G., Dewit, M., Staehelin, L.A. & Ohad, I. (1986) Transient inactivation of the thylakoid photosystem II lightharvesting protein kinase system and concomitant changes in intramembrane particle size during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 103: 71-80.
- Sen Gupta, A., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J. & Allen, R.D. (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1629-1633.
- Sen Gupta, A., Webb, R.P., Holaday, A.S. & Allen, R.D. (1993b) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutaseoverexpressing plants. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.
- Shaalit, Y., Glazer, A., Bocion, P.F. & Gressel, J. (1988) Cross tolerance to herbicide and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur-dioxide and ozone. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31: 13-23.
- Siefermann, D. & Yamamoto, H.Y. (1974a) Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. VI. De-epoxidation in grana and stroma lamellae. *Plant Physiol.* 57: 939-940.
- Siefermann, D. & Yamamoto, H.Y. (1974b) Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. III. Reaction kinetics and effect of light intensity on de-epoxidase activity and substrate availability. *Biochim. Biophys. Acta* 357: 144-150.
- Siefermann, D. & Yamamoto, H.Y. (1975a) Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron-transport conditions on violaxanthin availability. *Biochim. Biophys. Acta* 387: 149-158.
- Siefermann, D. & Yamamoto, H.Y. (1975b) Properties of NADPH and oxygen-dependent zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 70-77.
- Siefermann-Harms, D. (1977) The xanthophyll cycle in higher plants. In: *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (Tevini, M. & Lichtenthaler, H.K., eds.), Springer, Berlin, pp. 218-230.
- Siefermann-Harms, D. (1985) Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* 811: 325-355.



- Siendones, E., González-Reyes, J.A., Santos-Ocaña, C., Navas, P., & Córdoba, F. (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol.* 120: 907-912.
- Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78: 661-669.
- Smirnoff, N. (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 1455-1464.
- Smirnoff, N. & Pallanca, J.E. (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 472-478.
- Sonoike, K. (1996) Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 239-247.
- Soós, V., Szigeti, Z., Jóri, B., Rácz, I., Bratek, Z. & Lásztity, D. (2004) Novel aspects of paraquat resistance of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Abstracts of 4<sup>th</sup> International Weed Science Congress*, June 20-24, Durban (South Africa), p. 53.
- Souza Machado, V., Bandeen, J.D., Stephenson, G.R. & Lavigne, P. (1978) Uniparental inheritance of chloroplast atrazine tolerance in *Brassica campestris*. *Can. J. Plant Sci.* 58: 977-981.
- Stowe, A.E. & Holt, J.S. (1988) Comparison of triazine-resistant and -susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* and their F1 hybrids. *Plant Physiol.* 87: 183-189.
- Streb, P., Feierabend, J. & Bligny, R. (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell Environ.* 20: 1030-1040.
- Strzalka, K. & Gruszczyński, W.I. (1997) Modulation of thylakoid membrane fluidity by exogenously added carotenoids. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 1: 103-108.
- Sturgeon, B.E., Sipe, H.J., Barr, D.P., Corbett, J.T., Martinez, J.G. & Mason, R.P. (1998) The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbate – implications for the radical sink hypothesis. *J. Biol. Chem.* 273: 30116-30121.
- Sun, W.-H., Verhoeven, A.S., Bugos, R.C. & Yamamoto, H.Y. (2001) Suppression of zeaxanthin formation does not reduce photosynthesis and growth of transgenic tobacco under field conditions. *Photosynth. Res.* 67: 41-50.
- Sundby, C., McCaffery, S., Chow, W.S., & Anderson, J.M. (1992) Photosystem II function, photoinhibition and turnover of the D1 protein at different irradiances in normal and atrazine-resistant plants with an altered Q<sub>B</sub>-binding site. In: *Research in Photosynthesis*, Murata, N., ed., Vol. IV, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 443-447.
- Sundby, C., Chow, W.S., & Anderson, J.M. (1993) Effects on photosystem II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of Serine-264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiology* 103: 105-113.
- Szigeti, Z., Pölös, E. & Lehocski, E. (1988) Fluorescence properties of paraquat-resistant *Conyza* leaves. In: H.K. Lichtenthaler (ed.): *Applications of Chlorophyll Fluorescence*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 109-114.
- Szigeti, Z., Darkó, É., Nagy, E. & Lehocski, E. (1994) Diquat resistance of different paraquat resistant *Conyza canadensis* Cronq. Biotypes. *J. Plant Physiol.* 144: 686-690.
- Tardy, F. & Havaux, M. (1997) Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1330: 179-193.



- Telfer, A., Dhami, S., Bishop, S.M., Phillips, D. & Barber, J. (1994)  $\beta$ -carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 33: 14469–14474.
- Thayer, S.S. & Björkman, O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth. Res.* 23: 331–343.
- Thayer, S.S. & Björkman, O. (1992) Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynth. Res.* 33: 213–225.
- Trebst, A. & Depka, B. (1997) Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 400: 359–362.
- Turcsányi, E., Darkó, É., Borbély, G. & Lehocski, E. (1998) The activity of oxyradical-detoxifying enzymes is not correlated with paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 1–11.
- Tyystjärvi, E. & Aro, E.-M. (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2213–2218.
- van Oorschot, J.L.P. & Leeuwen, P.H. (1984) Comparison of the photosynthetic capacity between intact leaves of triazine-resistant and -susceptible biotypes of six weed species. *Z. Naturforsch.* 39c: 440–442.
- van Oorschot, J.L.P. & Leeuwen, P.H. (1989) Photosynthetic capacity of intact leaves of resistant and susceptible cultivars of *Brassica napus* L. to atrazine. *Weed Res.* 29: 29–32.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. & Andersson, B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1408–12.
- Váradi, Gy., Lehocski, E., Szigeti, Z. & Pölös, E. (1990) Short-term paraquat effects on paraquat-resistant horseweed (*Conyza canadensis*). *Proc. 9th Australian Weeds Conference*, Adelaide (Australia), pp. 257–259.
- Váradi, Gy., Botos-Bálo, B. & Pölös, E. (1992) Xanthophyll cycle in grapevine leaves: diurnal and seasonal patterns. *Proc. 4th International Symposium on Grapevine Physiology*, San Michele all'Adige - Torino (Italy), 11–15 May, pp. 521–526.
- Váradi, Gy. & Pölös, E. (1992) Defence mechanisms against photo-oxidative damage in paraquat-atrazine co-resistant *Conyza (Erigeron) canadensis*. In: *Research in Photosynthesis* (N. Murata, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. IV, pp. 495–499.
- Váradi, Gy. & Pölös, E. (1993) The xanthophyll cycle in the wild and the paraquat-resistant biotypes of horseweed (*Conyza (Erigeron) canadensis*). *Abstracts of XVth International Botanical Congress*, Yokohama, 28 August - 3 September, p. 418.
- Váradi, Gy., Darkó, É., Pölös, E., Szigeti, Z., & Lehocski, E. (1994a) Xanthophyll cycle patterns and *in vivo* photoinhibition in herbicide-resistant biotypes of *Conyza canadensis*. *J. Plant Physiol.* 144: 669–674.
- Váradi, Gy., Darkó, É., Pölös, E., Szigeti, Z. & Lehocski, E. (1994b) Xanthophyll cycle pattern and *in vivo* photoinhibition in atrazine-resistant biotypes of *Conyza canadensis* and *Chenopodium album*. In: *Proc. 9th Congress of the Federation of European Societies Plant Physiology*, Brno (Czech Republic), 3–8 July. *Biol. Plant.* 36(suppl.): S168.
- Váradi, Gy., Darkó, É., Pölös, E., Szigeti, Z. & Lehocski, E. (1995) Xanthophyll cycle patterns and *in vivo* photoinhibition in paraquat- and atrazine-resistant, paraquat-atrazine co-resistant and susceptible biotypes of *Conyza canadensis*. *Univ.*

Córdoba, *Actas No. 24: Proc. International Symposium on Weeds and Crops Resistant to Herbicides*, Córdoba (Spain), 3-6 April, pp. 121-123.

- Váradi, Gy., Bálo, B., Pölös, E. & Bodor, L. (1997) Xanthophyll cycle and other photosynthetic pigments in virus infected Chardonnay vine leaves. *Proc. 5th International Symposium on Grapevine Physiology*, Jerusalem, Israel, 25-30 May, p. 66.
- Váradi, Gy., Darkó, É. & Lehoczki, E. (1998a) Altered light response of xanthophyll cycle in herbicide-resistant *Erigeron canadensis* biotypes in the presence of paraquat. In: G. Garab, ed, *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Vol V, pp. 3901-3904.
- Váradi, Gy., Simon, T. & Bálo, B. (1998b) Light distribution and leaf carotenoid patterns in the canopy. *Proc. 10th GESCO Meeting*, May 25-30, Changins (Switzerland), pp. 79-83.
- Váradi, Gy., Darkó, É. & Lehoczki, E. (2000) Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis*. *Plant Physiol.* 123: 1459-1469.
- Váradi, Gy., Polyánka, H., Darkó, É. & Lehoczki, E. (2003) Atrazine resistance entails a limited xanthophyll cycle activity, a lower PS II efficiency and an altered pattern of excess excitation dissipation. *Physiol. Plant.* 118: 47-56.
- Veljovic-Jovanovic, S.D., Pignocchi, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2001) Low ascorbic acid in the *vtc1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* 127: 426-435.
- Verhoeven, A.S., Adams, W.W., Demmig-Adams, B., Croce, R. & Bassi, R. (1999) Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperature and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiol.* 120: 727-737.
- von Caemmerer, S. & Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- Wallsgrave, R.M., Turner, J.C., Hall, N.P., Kendall, A.C. & Bright, S.W.J. (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase—biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* 83: 155-158.
- Walters, R.G. & Horton, P. (1994) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta* 195: 248-256.
- Walters, R.G., Ruban, A.V. & Horton, P. (1994) Higher plant light-harvesting complexes LHCIIa and LHCIIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 226: 1063-1069.
- Walters, R.G., Ruban, A.V. & Horton, P. (1996) Identification of proton-active residues in higher plant light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14204-14209.
- Warwick, S.I. (1980) Differential growth between and within triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* L. *Weed Res.* 20: 299-303.
- Warwick, S.I. & Black, L. (1981) The relative competitiveness of atrazine susceptible and resistant populations of *Chenopodium album* and *C. strictum*. *Can. J. Bot.* 59: 689-693.
- Warwick, S.I. & Marriage, P.B. (1982a) Geographical variation in populations of *Chenopodium album* resistant and susceptible to atrazine. I. Between- and within-population variation in growth and response to atrazine. *Can. J. Bot.* 60: 483-493.

- Warwick, S.I. & Marriage, P.B. (1982b) Geographical variation in populations of *Chenopodium album* resistant and susceptible to atrazine. II. Photoperiod and reciprocal transplant studies. *Can. J. Bot.* 60: 494-504.
- Weaver, S.E. & Warwick, S.I. (1982) Competitive relationships between atrazine resistant and susceptible populations of *Amaranthus retroflexus* and *A. powellii* from Southern Ontario. *New Phytol.* 92: 131-139.
- Weaver, S.E., Warwick, S.I. & Thomson, B.K. (1982) Comparative growth and atrazine response of resistant and susceptible populations of *Amaranthus* from Southern Ontario. *J. Appl. Ecol.* 19: 611-620.
- Wheeler, G.L., Jones, M.A. & Smirnoff, N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369.
- Whitmarsh, J., Samson, G. & Poulson, M. (1994) Photoprotection in photosystem II - the role of cytochrome *b<sub>559</sub>*. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. (N.R. Baker & J.R. Bowyer, eds.) BIOS Sci. Publ., Oxford, pp. 75-93.
- Wiese, C., Shi, L.-B. & Heber, U. (1998) Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation. *Physiol. Plant.* 102: 437-446.
- Wildi, B. & Lutz, C. (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell Environ.* 19: 138-146.
- Yamamoto, H.Y. (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure Appl. Chem.* 51: 639-648.
- Yamamoto, H.Y. & Bassi, R. (1996) Carotenoids: localization and function. In: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Advances in Photosynthesis 4*. (Ort, D.R. & Yocum, C.F., eds.) Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 539-563.
- Yamamoto, H.Y., Chenchin, E.E. & Yamada, D.K. (1974) Effect of chloroplast lipids on violaxanthin de-epoxidase activity. In: *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Congress on Photosynthesis* (Avron M., ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1999-2006.
- Yamamoto, H.Y. & Higashi, R.M. (1978) Violaxanthin de-epoxidase. Lipid composition and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 514-522.
- Yamamoto, H.Y. & Kamite, L. (1972) The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500 nm region. *Biochim. Biophys. Acta* 267: 538-543.
- Yamamoto, H.Y., Nakayama, T.O.M. & Chichester, C.O. (1962) Studies on the light interconversion of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 168-173.
- Youngman, R.J. & Dodge, A.D. (1981) On the mechanism of paraquat-resistance in *Conyza* sp. In: *Photosynthesis VI. Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment*. (G. Akoyunoglou, ed.), Balaban International Science Services, Philadelphia. Pp. 537-544.
- Zakharov, S.D., Ewy, R.G. & Dilley, R.A. (1993) Subunit III of the chloroplast ATP-synthase can form a  $Ca^{2+}$ -binding site on the lumenal side of the thylakoid membrane. *FEBS Lett.* 336: 95-99.
- Zanin, G. & Lucchin, M. (1990) Comparative growth and population dynamics of triazine-resistant and susceptible biotypes of *Solanum nigrum* L. in relation to maize cultivation. *J. Genet. Breed.* 44: 207-216.



### 3. Köszönetnyilvánítás

Munkámat elsősorban szüleim emlékének ajánlom, akik lehetővé tették számomra, hogy elinduljak pályámon. Köszönettel tartozom témavezetőmnek és munkatársaimnak, hogy segítették munkámat, családomnak, hogy türelemmel álltak mögöttem.

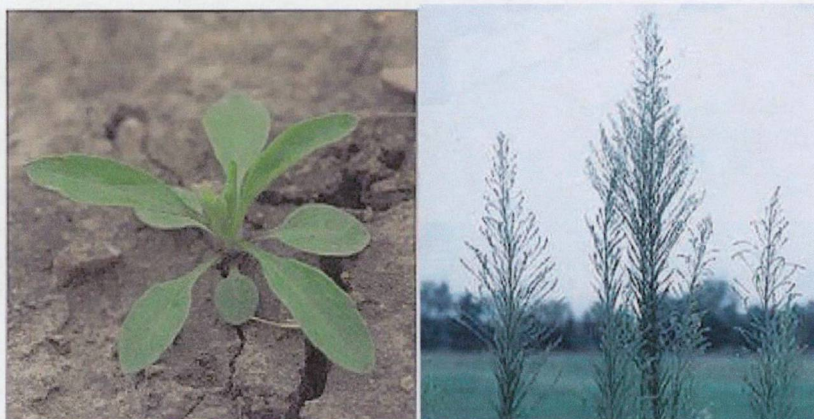
A dolgozatban közzétett eredményekhez szolgáló kísérletsorozatok az OTKA a 384-es, a T-016445 és a T-035252 számú kutatási projektek keretében támogatta.

# Függelék

## 1. Függelék

### A vizsgált növényfajok fotói

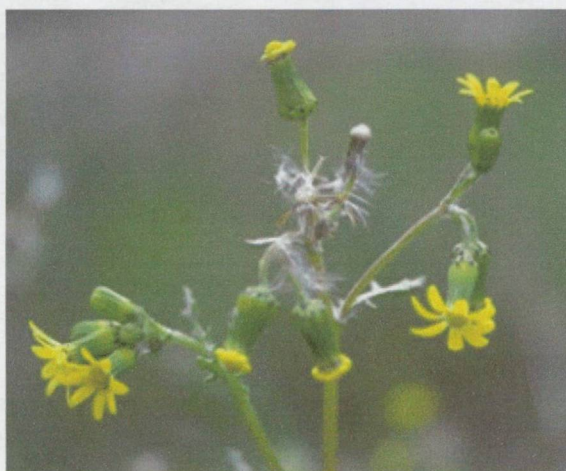
Betyárkóró (*Erigeron canadensis* L.)



Fekete csucsor (*Solanum nigrum* L.)



Közönséges aggófű (*Senecio vulgaris* L.)





Libatop (*Chenopodium album* L.)



Füzike (*Epilobium adenocaulon* Hausskn.)



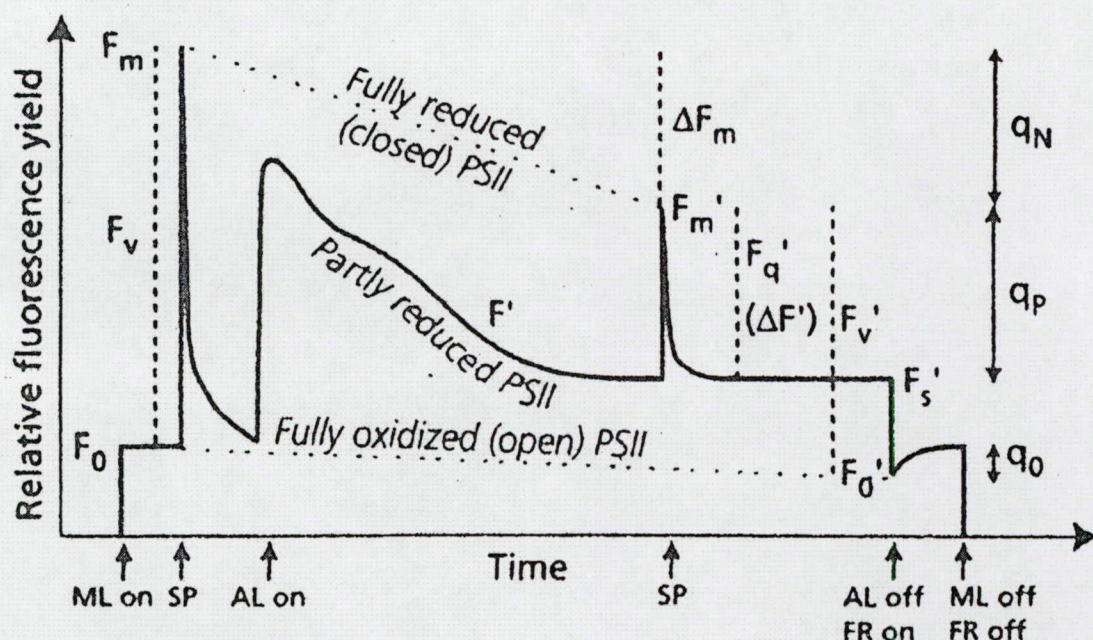
Szőrös disznóparéj (*Amaranthus retroflexus* L.)





## 2. Függelék

### A klorofill a fluoreszcencia indukciómérés alapvető definíciói



A modulált klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérések nevezéktanát és definícióit bemutató vázlat sötétadaptált levelekkel kezdődő mérések során. ML = modulált mérőfény, SP = telítési fényimpulzus, AL = aktinikus fény, FR = a PSI-et gerjesztő távoli vörös fény. (van Kooten & Snel 1990 után módosítva)

Paraméter	Megnevezés
$F_0$	kezdeti (alap) fluoreszcencia sötétadaptált levélben
$F_m$	maximális fluoreszcencia sötétadaptált levélben
$F_v$	változó fluoreszcencia sötétadaptált levélben
$F_v/F_m$	a PSII maximális kvantumhatásfoka
$F_s$	aktinikus fény mellett mért egyensúlyi fluoreszcencia
$F'_m$	aktinikus fény mellett mérhető maximális fluoreszcencia
$F'_0$	megvilágított levélben mérhető alap fluoreszcencia
$\Delta F$	$F'_m - F_s$
$\Delta F/F'_m$	a PSII aktuális kvantumhatásfoka
NPQ	nem-fotokémiai kioltás
$q_E$	az NPQ energiafüggő komponense
$q_P$	a PSII fotokémiai kioltási koefficiense



### 3. Függelék

A fekete csucsor D1 protein mutáns (AR) biotípusának csökkent növekedése





#### 4. Függelék

##### A Pq-kezelt PqR betyarkóró növekedésbeli elmaradása

(ML = közepes fényintenzitás, HL = intenzív megvilágítás)



A rezisztens betyarkóró látszólag tünetmentesen túlélte a Pq-kezelést, de a kontrollhoz képest visszamaradt a növekedésben. A hatás különösen az erős fényen tartott növények esetében kifejezett, például azt sejtetve, hogy a túlzott gerjesztési energiákkal szemben kevésbé hatékony a védelmi rendszere.